

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Bioactivités de biomolécules extraites à partir de
biomasse de coproduits agricoles : propolis, cladodes
du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*) et
grignons d'olives**

Présenté par : AKNOUCHE Siham

ARICHE Aldjia

Devant le jury :

Promotrice : DERMECHE Samia

Maitre assistante classe A UMMTO

Président : TITOUCHE Yacine

Maitre assistant classe A UMMTO

Examinatrice 1 : ASMANI Katia

Maitre de conférence classe A UMMTO

Examinatrice 2 : ISSELNANE-Tamache Souad Maitre assistante classe A UMMTO

Année : 2017/2018

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université de Tizi-Ouzou.

En premier lieu, on remercie ALLAH le tout puissant de nous avoir accordé la santé, le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

On tient à remercier Monsieur Le Professeur Abderrahmane MATI, Directeur du laboratoire (LABAB) pour nous y avoir permis de mener ce travail dans de bonnes conditions, ainsi qu'à toutes les équipes de recherche et les ingénieurs du LABAB.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Madame DERMECHE Samia, notre promotrice. Qu'elle trouve ici l'expression de notre très vive reconnaissance pour son aide, ses conseils, sa confiance ainsi qu'à ses qualités relationnelles et humaines très agréables.

Un remerciement spécial et sincère à Monsieur TITOUCHE Yacine qui nous a beaucoup soutenus lors des manipulations au laboratoire, il a souvent su conseiller et surtout nous encourager.

Nous voudrions exprimer nos gratitudee à Madame ASMANI Katia et Madame ISSELNANE-TAMACHE Souad qui nous font l'honneur en acceptant d'examiner ce travail.

Dédicaces

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a
tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser
ce travail que je dédie :*

*A mes chers parents et ma tante
Ouardia A ma sœur Zahia et mes frères*

A mon cher Juba

A Djoudjou

A Aldjia

A mes professeurs

A mes amis

A vous ...

Siham

Dédicaces

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a
tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser
ce travail que je dédie :*

A mes chers parents

A mes sœurs et mes frères

A mon grand-père Mohammed

A mes cousins et cousines

A Elisa et Siham

A mes professeurs

A mes amis

A vous ...

Aldjia

Sommaire	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
I. Introduction	
Partie I: Synthèse des données bibliographiques	
Chapitre I : Les composés phénoliques	
1.1. Généralités	1
1.2. Diversités structurale et sources alimentaires	1
1.3. Biosynthèse des composés phénoliques	6
1.4. Fonctions biologiques et applications industrielles des polyphénols	9
ChapitreII: Présentation des coproduits agricoles	
2.1. Propolis	12
2.1.1. Définition et Etymologie	12
2.1.2. Historique de la propolis	12
2.1.3. Origine botanique de la propolis	13
2.1.4. Récolte de la propolis	14
2.1.5. Caractéristiques physico-chimiques de la propolis	14
2.1.6. Propriétés biologiques de la propolis	17
2.1.7. Utilisation de la propolis	18
2.2. Cladodes du figuier de barbarie	19
2.2.1. Fiquier de barbarie (<i>Opuntia ficus indica</i>)	19
2.2.1.1. Historique	19
2.2.1.2. Définition	19
2.2.1.3. Classification	20
2.2.1.4. Origine et Distribution géographique de <i>Opuntia ficus indica</i>	20
2.2.1.5. Exigences écologiques	20
2.2.2. Cladodes du figuier barbarie	21
2.2.2.1. Morphologie	21
2.2.2.2. Composition chimique	22
2.2.2.3. Utilisation des cladodes	23
2.2.2.4. Activités biologiques	24
2.3. Grignons d'olives	24
2.3.1. Méthodes d'obtention des grignons d'olives	25
2.3.2. Caractéristiques chimiques des grignons d'olives	26
2.3.4. Utilisation des grignons d'olives	27

2.3.5. Amélioration de la valeur alimentaire des grignons d'olives	28
--	----

PartieII. Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes.....	30
1.1. Matériel	30
1.2. Méthodes	33
1.2.1. Caractérisation physico-chimique des coproduits végétaux (grignons d'olives, propolis, cladodes du figuier de barbarie)	33
1.2.1.1. Détermination de la teneur en eau et de la matière sèche totale	33
1.2.1.2. Teneur en cendre et en matière organique	34
1.2.1.3. Détermination du pH	35
1.2.2. Extraction des composés phénoliques.....	35
1.2.2.4. Rendement d'extraction des composés phénoliques.....	38
1.2.3. Dosage des composés phénoliques totaux par colorimétrie	39
1.2.4. Essai de caractérisation des composés phénoliques par chromatographie sur couche mince.....	40
1.2.5. Test de l'activité anti-oxydante	40
1.2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne	43
1.2.7. Analyse statistique.....	45
II. Résultats et discussion	46
2.1. Evaluation de quelques caractéristiques physico-chimiques des coproduits utilisés.	46
2.2. Rendement de l'extraction des polyphénols	47
2.3. Dosage des composés phénoliques totaux contenus dans les extraits	48
2.4. Analyse qualitative des composés phénoliques par chromatographie sur couche mince (CCM)	50
2.5. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques	52
2.6. Évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur milieu solide	57
2.7. Analyse statistique	59
Conclusion	
Annexes	
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

EEP	Extrait éthanoïque de propolis.
EAP	Extrait d'acétate d'éthyle de propolis.
EEC	Extrait éthanoïque de cladodes de figuier de barbarie.
EAC	Extrait d'acétate d'éthyle de cladodes de figuier de barbarie.
EEG	Extrait éthanoïque des grignons d'olives.
EAG	Extrait d'acétate d'éthyle des grignons d'olives.
ABTS	2,2-azini-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate.
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power.
IC₅₀	Concentration équivalente à 50% de DPPH inhibés ou ABTS inhibé.
PR_{0,5}	concentration d'un composé en µg/ml qui donne une densité optique de 0,5.
R_f	Rapport frontal.
CCM	Chromatographie sur couche mince
DM	Dry matter
mg EAG /g ms	Milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche.
R%	Rendement.
H%	Teneur en eau.
TC%	Teneur en cendre.
MO%	Teneur en matière organique.
R	Coefficient de corrélation linéaire.
DO	Densité optique.
UV	Ultra-violet.

Liste des figures

N°	Intitulés	Pages
1	Le plus simple des composés phénoliques (A) et l'acide gallique (B).	2
2	Tannins condensés.	4
3	Principaux constituants de la lignine.	4
4	La biosynthèse des composés phénoliques par la voie d'acétate malonate.	6
5	Biosynthèse des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine) par la voie de shikimate	7
6	Biosynthèse des composés phénoliques par la voie de phénylalanine.	9
7	Structure chimique d'un anion phénoxyde.	10
8	Méthodes d'extraction de l'huile d'olive par les systèmes discontinu et continu.	25
9	Photographie de la propolis de la région de Tizirt.	30
10	Raquettes d' <i>Opuntia ficus indica</i> à l'état frais.	31
11	Photographie des grignons d'olives.	31
12	Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olives en utilisant deux solvants organiques (acétate d'éthyle et éthanol).	36
13	Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir de la propolis en utilisant deux solvants organiques (acétate d'éthyle et éthanol).	37
14	Protocole d'extraction de composés phénoliques à partir de cladodes du figuier de barbarie avec deux solvants organiques (acétate d'éthyle et éthanol).	38
15	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	39
16	Structure du DPPH · et sa réduction par l'antioxydant RH	41
17	Processus de réduction du radical ABTS ^{•+} en présence d'un antioxydant.	42
18	Teneur en polyphénols des différents extraits.	48
19	Profil chromatographique en composés phénoliques des différents échantillons extraits avec l'acétate d'éthyle et l'éthanol.	50
20	Les IC50 des différents extraits phénoliques et standards donnés par le test au DPPH.	53
21	Les IC50 des différents extraits phénoliques et standard donnés par le test à l'ABTS	56
22	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) résultants de l'action des différents extraits phénoliques sur <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Escherichia coli</i> .	58

23	Corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire ABTS et le pouvoir réducteur	60
24	Corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire DPPH et le pouvoir réducteur	60
25	Corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire ABTS et DPPH	61

Liste des tableaux

N°	Intitulés	pages
I	Principales classes des composés phénoliques.	5
II	Sources botaniques de la propolis selon les différentes régions.	13
III	Composition chimique de la propolis.	16
IV	Composition en polyphénols des cladodes du <i>Opuntia ficus- indica</i> .	23
V	Caractéristiques des grignons d'olives bruts issus de divers procédés d'extraction de l'huile.	26
VI	Les composants minéraux des grignons d'olives bruts ainsi que leurs teneurs respectives (%).	26
VII	Appareillage utilisé lors du travail expérimental	32
VIII	Tableau représentant les produits chimiques, réactifs, solvants organiques, sels et milieux de culture utilisés.	33
IX	Les souches bactériennes testées.	43
X	Tableau récapitulatif des paramètres physicochimiques de trois échantillons étudiés (propolis, cladodes du figuier de barbarie et grignons d'olives).	46
XI	Rendement de l'extraction des polyphénols exprimé en pourcentage pour les différents extraits étudiés.	47
XII	Rapports frontaux (R _f) des spots des extraits phénoliques et des standards dans le système : chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique (50/40/10) (v/v/v).	51
XIII	Concentration des extraits donnant après réduction de ferrocyanure de potassium une absorbance de 0,5	55

Résumé

Dans le cadre de la découverte de nouvelles substances naturelles bioactives ayant des propriétés biologiques, le présent travail s'intéresse à l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de composés phénoliques de six extraits issus de trois coproduits végétaux : la propolis, les cladodes du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*) et les grignons d'olives.

L'activité antioxydante des extraits polyphénoliques est évaluée par trois méthodes : piégeage du radical libre DPPH / ABTS et le pouvoir réducteur (FRAP). Les extraits sont testés pour leur pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

Le test de DPPH montre que les deux extraits de cladodes du figuier de barbarie possèdent une meilleure capacité réductrice (EEC ayant $IC_{50}=0,28$ mg/ml, EAC ayant $IC_{50}=0,23$ mg/ml) par rapport aux deux extraits de grignons d'olives (EEG d'un $IC_{50}=0,3$ mg/ml et EAG d'un $IC_{50}=0,8$ mg/ml). Tandis que, la plus faible activité antiradicalaire est enregistrée pour la propolis.

Cependant, les deux extraits de cladodes du figuier de barbarie ont montré une meilleure capacité réductrice (EEC avec $IC_{50}=0,3$ mg/ml, EAC avec $IC_{50}=0,1$ mg/ml) par rapport à celle de l'acide ascorbique ($IC_{50}=0,37$ mg/ml). Les autres extraits possèdent des activités moins importantes estimées par des IC_{50} allant de 0,4 à 5,6 mg/ml.

Tous les extraits sont doués d'un pouvoir réducteur supérieur à celui de l'acide ascorbique ($PR_{0,5}= 58,13$ µg/ml). Les extraits éthanoïques présentent les meilleures pouvoirs réducteurs (EEC avec $PR_{0,5}=5,3$ µg/ml, EEP avec $PR_{0,5}=12,89$ µg/ml et EEG avec $PR_{0,5}=6,5$ µg/ml) par rapport aux extraits d'acétate d'éthyle (EAC de $PR_{0,5}=18,7$ µg/ml, EAP de $PR_{0,5}=35,93$ µg/ml et EAG de $PR_{0,5}=58$ µg/ml).

Concernant l'activité antimicrobienne les deux extraits de la propolis ont montré une activité contre la souche Gram+ *Staphylococcus aureus* et la souche Gram- *Klebsiella pneumoniae*.

Ainsi, les coproduits agricoles à l'instar de la propolis, cladodes du figuier de barbarie et des grignons d'olives constituent des sources intéressantes en molécules bioactives.

Mots clés : Polyphénols, activité antioxydante, activité antimicrobienne, propolis, cladodes du figuier de barbarie, grignons d'olives.

Abstract

In the context of the discovery of new substances with biological properties from natural sources, we are interested in this work to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds of six extracts from three plant co-products: propolis cladodes of prickly pear (*Opuntia ficus indica*) and olive pomace.

The evaluation of the antioxidant activity of the extracts was realised by three methods: free radical trapping DPPH / ABTS and the reducing power (FRAP), as well as the evaluation of the antibacterial activity by the diffusion method on agar medium.

The DPPH test shows that the two extracts of cladodes have a better reducing capacity (EEC having $IC_{50} = 0.28$ mg / ml, EAC having $IC_{50} = 0.23$ mg / ml) in comparison with the two extracts of olive pomace (EEG of $IC_{50} = 0.3$ mg / ml and EAG of $IC_{50} = 0.8$ mg / ml) While, the weakest antiradical activity is recorded by propolis. However, both extracts of prickly pears showed better reductive capacity (EEC with $IC_{50} = 0.3$ mg / ml, EAC with $IC_{50} = 0.1$ mg / ml) compared to that of ascorbic acid ($IC_{50} = 0.37$ mg / ml). The other extracts have smaller activities estimated by IC_{50} ranging from 0.4 to 5.6 mg / ml. All the extracts are endowed with a reducing power greater than that of ascorbic acid ($PR_{0.5} = 58.13$ μ g / ml). The ethanoic extracts have the best reducing powers (EEC with $PR_{0.5} = 5.3$ μ g / ml, EEP with $PR_{0.5} = 12.89$ μ g / ml and EEG with $PR_{0.5} = 6.5$ μ g / ml) compared to extracts of ethyl acetate (EAC of $PR_{0.5} = 18.7$ μ g / ml, EAP of $PR_{0.5} = 35.93$ μ g / ml and EAG of $PR_{0.5} = 58$ μ g / ml). Regarding the antimicrobial activity, the two propolis extracts showed an activity against the Gram + *Staphylococcus aureus* strain and the Gram-*Klebsiella pneumoniae* strain.

Thus, agricultural co-products such as propolis, cladodes of prickly pear and olive pomace constitute an interesting source of bioactive molecules.

Key words: polyphenols, antioxidant activity, antimicrobial activity, propolis, prickly pear cladodes, olive pomace.

Introduction

I. Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité utilise diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. En effet, les plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique. De plus, les extraits de plantes possèdent un très large éventail d'activités biologiques essentiellement comme antioxydants et antimicrobiens.

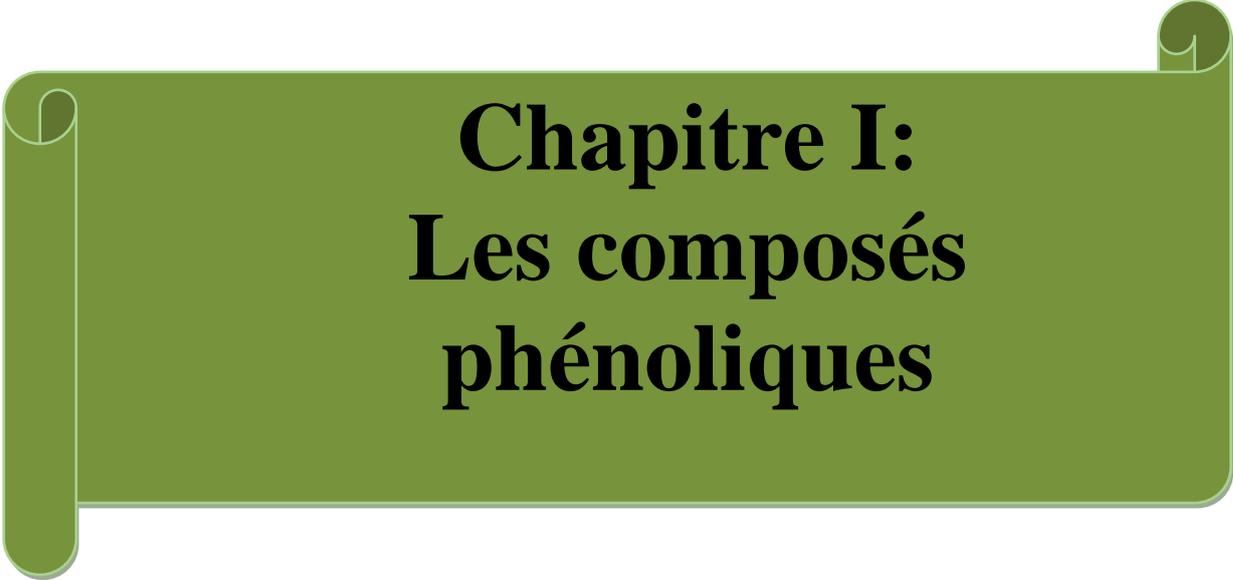
Certains coproduits agricoles ont fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques depuis plusieurs décennies. C'est le cas notamment des cladodes du figuier de Barbarie, de la propolis et des grignons d'olives, qui recèlent de multiples propriétés biologiques liées à leur consistance en polyphénols qui sont des micronutriments particulièrement abondants dans les fruits, les céréales et les légumes ainsi que dans des boissons comme le thé et les jus de fruits. Ces composés d'intérêt biologique sont caractérisés par la présence d'au moins un motif phénolique (cycle aromatique sur lequel viennent se greffer un ou plusieurs groupements – OH). Une des particularités des polyphénols réside dans leur grande diversité. Leurs effets bénéfiques qu'ils exercent sur l'organisme humain ont suscité beaucoup d'intérêt notamment dans le domaine de la médecine préventive. En effet, les polyphénols possèdent non seulement des propriétés anticancéreuses et antiscélératiques mais aussi ils peuvent participer à la bonne conservation de certains aliments transformés, comme l'huile d'olive, en limitant l'oxydation des lipides qu'ils contiennent.

Notre travail s'inscrit donc dans ce contexte de recherche de molécules bioactives. La première partie est consacrée à une étude bibliographique sur les polyphénols, leur biosynthèse, leurs sources, leur classification, leurs diverses propriétés biologiques et leurs utilisations. Ensuite, seront abordées les différentes connaissances bibliographiques sur les trois coproduits étudiés.

Dans la deuxième partie, seront développés le matériel et l'ensemble des techniques et méthodes utilisées pour l'extraction, le dosage colorimétrique des polyphénols, les activités anti-oxydantes, les activités antimicrobiennes des différents extraits.

La troisième partie sera consacrée à la discussion des résultats obtenus dans cette étude. Une conclusion générale est donnée à la fin du présent travail en tirant les principaux résultats obtenus. Ces derniers pourraient stimuler d'autres travaux de recherche dans le sens de servir et de valoriser le patrimoine national dans le domaine de bioressources végétales.

Partie I
Synthèse des données
bibliographiques



Chapitre I: Les composés phénoliques

1. Généralités

Les composés phénoliques représentent une multitude de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Ils sont présents dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (EL GHARRAS, 2009). Le terme Phénolique est utilisé pour désigner des substances qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique. Ce nom provient du composé parent le plus simple : le phénol (BRAVO, 1998).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des plantes et sont généralement impliqués dans la défense contre le rayonnement ultraviolet ou l'agression par des agents pathogènes. Ils n'exercent pas des fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal comme la croissance ou la reproduction (BHOOSHAN PANDEY et RIVIZI, 2009).

Les polyphénols présentent des propriétés antioxydantes bien établies en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Ces substances sont très recherchées dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif contre diverses maladies, en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier, sur la flaveur des aliments et leur incidence sur la conservation des produits alimentaires (ACHAT, 2013).

1.1. Diversité structurale et sources alimentaires

1.1.1. Diversité structurale des composés phénoliques

Les composés phénoliques (8000 molécules connues) représentent une des classes majeures de métabolites secondaires des plantes. Ils sont caractérisés par des structures et fonctions très diverses. Ils possèdent, au minimum, un cycle aromatique portant un à plusieurs groupes hydroxyles. Les acides phénoliques (acide gallique, Figure 1) représentent les formes les plus simples et les tanins, les formes les plus polymérisées de plus de 30000 Dalton (MEHINAGIC et *al.*, 2011).

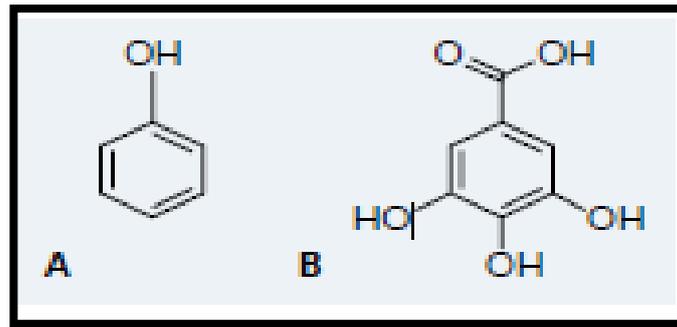


Figure 1. Le plus simple des composés phénoliques (A) et l'acide gallique (B) (MEHINAGIC et al., 2011)

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se distinguent par la complexité du squelette de base, allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées, ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques...) (GIBBS ,1976 ; PASCUAL-REGUERA et al.,1997).

1.1.1.1. Principales classes des composés phénoliques

1.1.1.1.1. Acides phénoliques simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du phénol en C6 (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches.

- **Acides hydroxybenzoïques**

Les acides hydroxybenzoïques (*p*-hydroxybenzoïques, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique...) sont dérivés de l'acide benzoïques et ont une formule de base de type C6-C1. Ils sont particulièrement bien représentés chez les gymnospermes et les angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal, en particulier de la lignine et de certains tanins.

- **Acides hydroxycinnamiques**

Ils dérivent de l'acide cinnamique et présentent une classe très importante dont la structure générale de base est de type (C6-C3). Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules (MACHEIX *et al.*, 2005).

- **Stilbènes**

Les membres de cette famille possèdent une structure C6-C2-C6. Comme les flavonoïdes avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle benzénique, portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, Ortho et para. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales (EL GHARRAS, 2009).

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes constituent une classe de composés phénoliques de structure générale en C15 (C6-C3-C6), comprend à elle seule plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique : les anthocyanes, pigments rouges ou bleus, les flavones et les flavonols, de couleur crème, les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tannins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine (TSAO, 2010).

1.1.1.1.2. Composés phénoliques condensés

Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples précédemment évoquées. Selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, on obtient des composés plus ou moins complexes pouvant encore présenter une hydrosolubilité suffisante pour être présents dans la vacuole (tannins, certains produits de brunissement) ou au contraire acquérir un caractère lipophile marqué et s'accumuler alors dans les structures pariétales (lignine, formes présentes dans la cutines et subérine...) (MACHEIX *et al.*, 2005).

- **Tannins**

Ce sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. Il est classique de distinguer deux grands groupes de tannins différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tannins hydrolysables lesquels sont des esters du glucose et d'acides phénols comme l'acide gallique et l'acide éllagique. Leurs polymères sont appelés des tannoïdes. Les tannins condensés non hydrolysables sont des polymères de flavonols (catéchols) et de proanthocyanidols qui donnent par ébullition avec les acides minéraux dilués des composés insolubles amorphes et de couleurs rouges appelés phlobaphènes ou rouge de tanins (ROUX et CATIER, 2007).

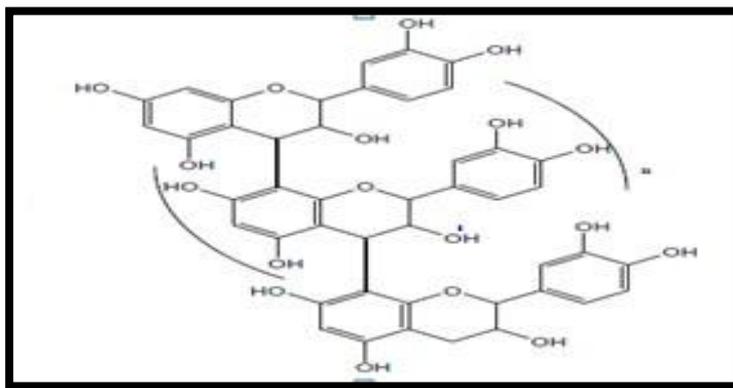


Figure 2. Tannins condensés (BOUBEKRI, 2014).

- **Lignines**

Les lignines résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois molécules phénoliques de base dénommées monolignols et qui sont les alcools coumaryliques, coniféryliques et sinapyliques (Figure.3).

La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus précisément dans les parois secondaires des éléments conducteurs. Elle présente un très grand polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, il est donc important de procéder à des dégradations très importantes avant de passer à son extraction. De plus les trois monomères de bases peuvent s'assembler de multiples façon formant une structure tridimensionnelle très ramifiée (HOPKINS, 2003)

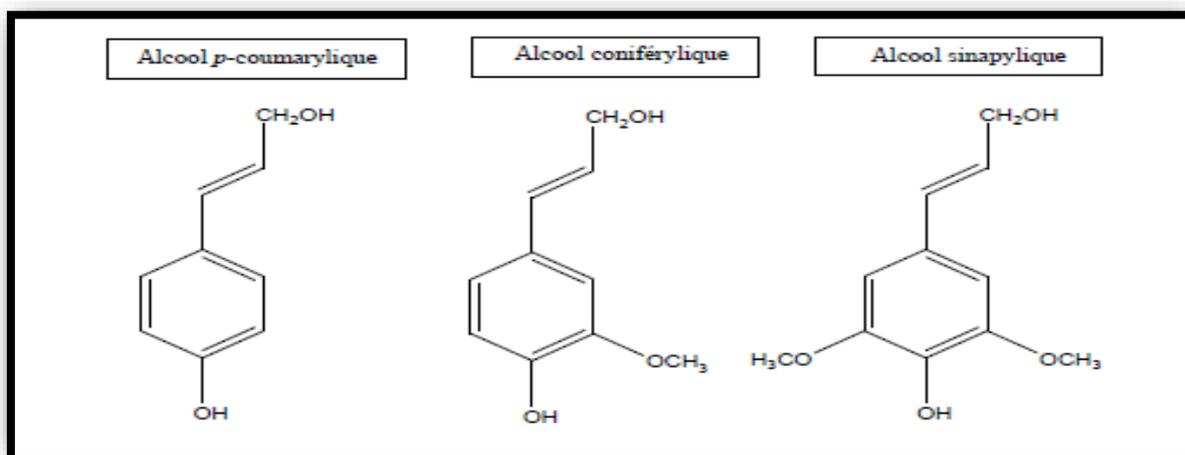
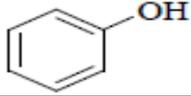
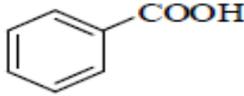
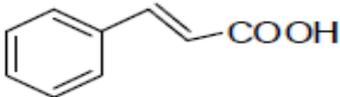
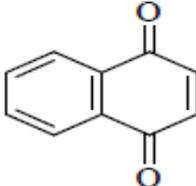
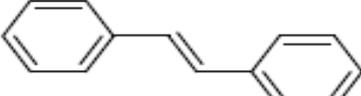
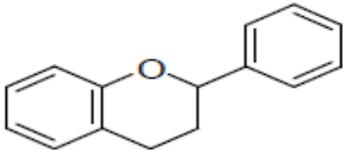


Figure 3. Principaux constituants de la lignine (BOUBEKRI, 2014)

Tableau I. Principales classes des composés phénoliques (REZAIRE, 2015).

Squelette carboné	Classe	Structures de base
C ₆	Phénols simples	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques coumarines	
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	

1.1.2. Sources alimentaires en polyphénols

Les composés phénoliques sont présents dans la plupart des végétaux, en particulier chez ceux que nous consommons régulièrement (MACHEIX et *al.*, 2005). Ils sont présents principalement dans les fruits, les légumes, les céréales et les boissons. Les fruits comme les raisins, les pommes, les poires, les cerises et les baies contiennent jusqu'à 200 à 300 mg de polyphénols par 100 g de poids frais. Généralement, une tasse de thé ou de café contient environ 100 mg de polyphénols. Les céréales, les légumes secs et le chocolat sont également riches en polyphénols (BHOOSHAN PANDEY et RIVIZI, 2009).

1.2. Biosynthèse des composés phénoliques

La biosynthèse des polyphénols a été largement discutée par de nombreux experts dans le domaine et les lecteurs sont référés aux revues récentes et aux livres pour plus de détails. Les expériences avec des précurseurs marqués au carbone (C) ont permis de préciser les principales étapes de la biosynthèse des polyphénols (KNAGGS, 2001 ; TSAO, 2010). Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques comme décrit ci-dessous.

1.2.1. Voie d'acétate malonate

Durant cette voie plusieurs unités acétates se condensent pour conduire à des dérivés β cétoniques qui se cyclisent ensuite. De cette voie résulte les chromones, les isocoumarines, et les quinones (BOUHEROUM, 2007).

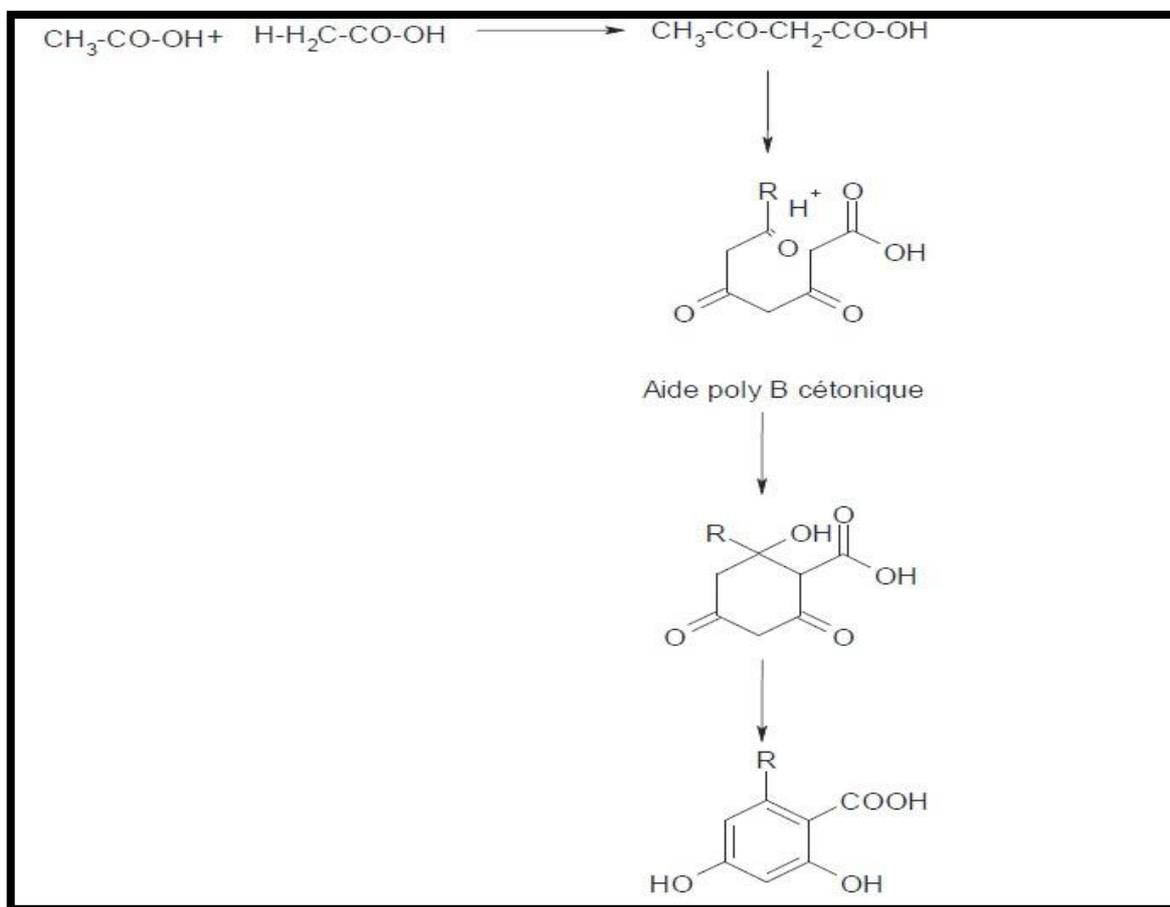


Figure 4. La biosynthèse des composés phénoliques par la voie d'acétate malonate (PORTES, 2008).

1.2.2. Voies de l'acide shikimique

Cette voie est liée au métabolisme des glucides et des acides aminés aromatiques. Les substances initiales sont ici les produits de la glycolyse et du cycle du pentose phosphate: le phosphoénolpyruvate et l'érythrose-4- phosphate. Leur condensation et cyclisation conduisent à la formation d'un intermédiaire important : l'acide shikimique. Celui-ci peut, soit se transformer en acide hydroxybenzoïques (par exemple acide gallique), soit, après l'adjonction d'une molécule supplémentaire de phosphoénolpyruvate et une série de stades intermédiaires suivie d'une amination, donnent naissance aux acides aminés aromatiques : la phénylalanine et la tyrosine (HARBORNE, 1990; BRUNETON, 1993 ; BRUNETON, 1999 ; KNAGGS, 2003 ; NACZK et SHAHIDI, 2004; CROZIER *et al*, 2006 ; MACHEIX *et al*, 2006) (Figure.5).

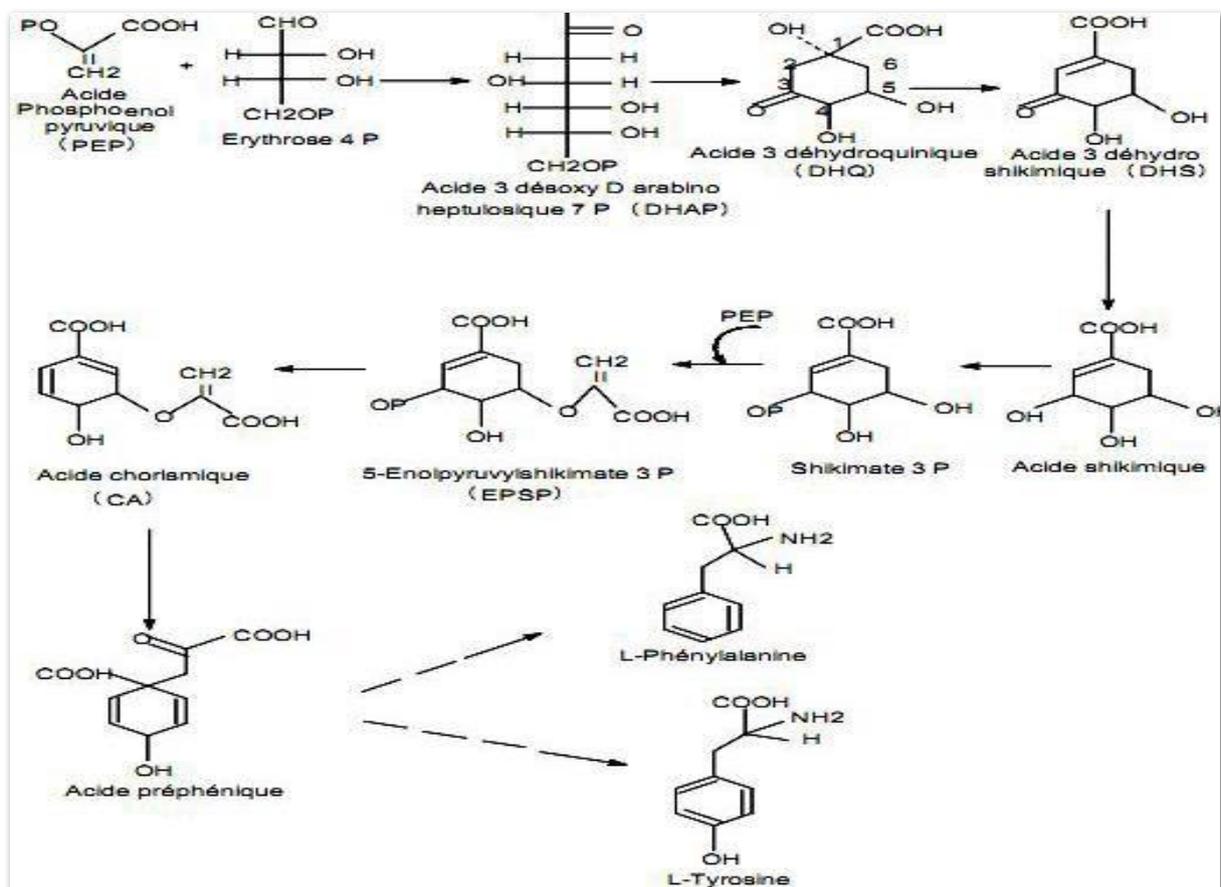


Figure 5. Biosynthèse des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine) par la voie de shikimate (PORTES, 2008).

La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, qui débute suite à la désamination de la phénylalanine sous l'action de la Phénylalanine Ammonia Liase (PAL), la phénylalanine libère un ion ammonium et forme de l'acide cinnamique. Celui-ci est à son tour hydroxylé par la Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H) pour former l'acide para-coumarique qui permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques : acides coumariques, caféiques, féruliques et sinapiques (RICHARD et DIXON, 1995) (Figure.6).

Les formes actives de ces derniers avec la coenzyme A permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques.

- ✓ **Acides benzoïques** : Par β -oxydation (acide gallique, protocatéchique ...). L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tanins hydrolysables (tanins galliques et ellagiques).
- ✓ **Esters chlorogéniques** : Par estérification avec un acide alcool (acides quinique, tartrique, shikimique ...).
- ✓ **Coumarines** : Par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycosylations, prénylations ...).
- ✓ **Lignines** : Par réduction, il y'a formation de monolignols suivie d'une polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases (MOUFFOK, 2011).

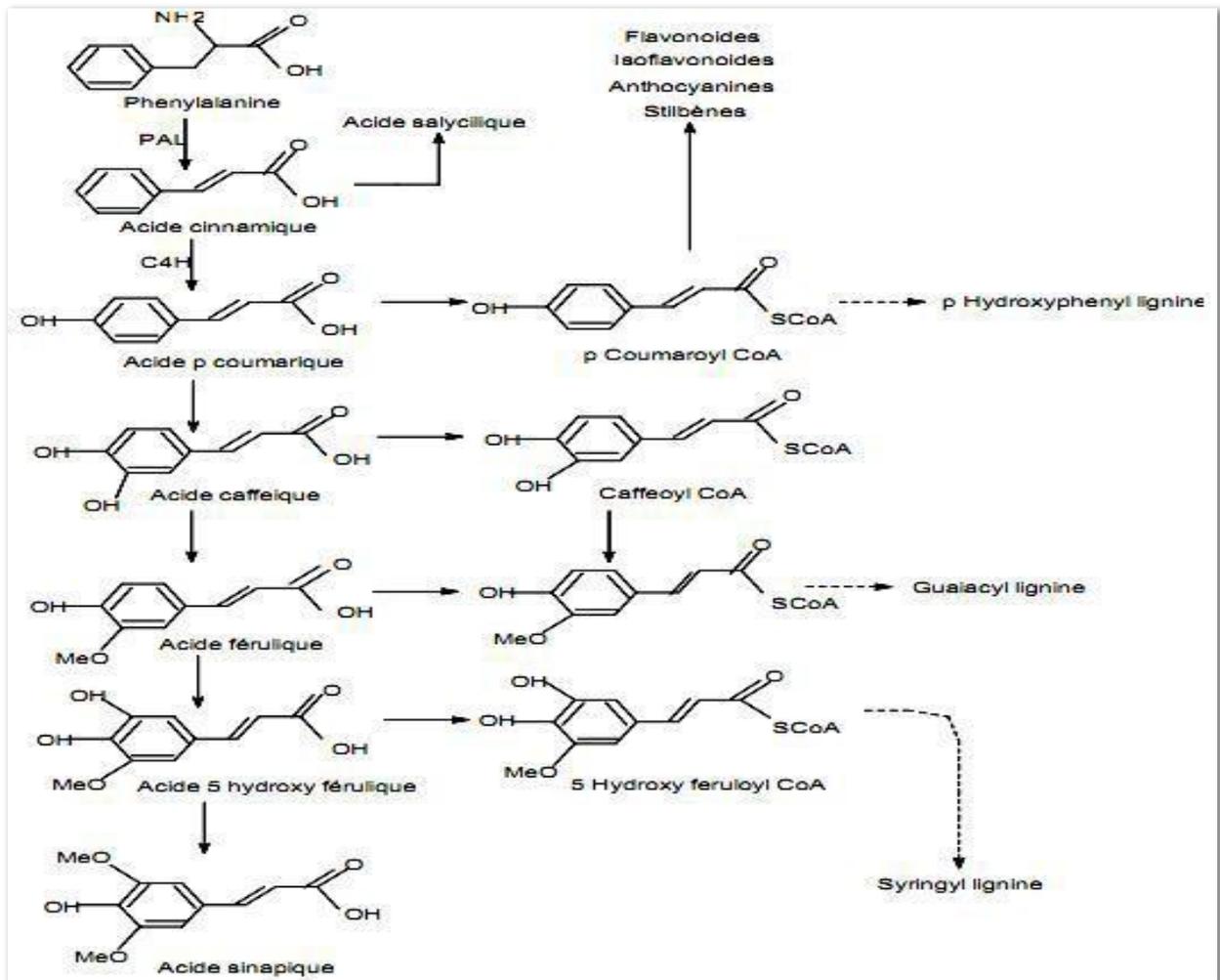


Figure 6. Biosynthèse des composés phénoliques par la voie de phénylalanine (PORTES, 2008).

1.4. Fonctions biologiques et applications industrielles des polyphénols

1.4.1. Fonctions biologiques

1.4.1.1. Propriétés antioxydantes

Cette propriété importante des groupements hydroxyles des phénols due à la labilité des protons acides, qui entraîne la formation d'anions phénoxydes stabilisés par résonance. Cet anion a la possibilité de perdre un électron pour former un radical, l'électron lui, peut être récupéré par un radical libre (SARTORI-THIEL, 2003). La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, donc une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical (LEOPOLDINI *et al.*, 2011).

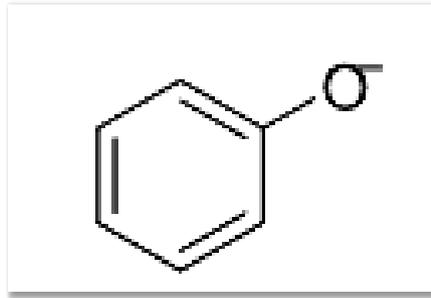


Figure 7. Structure chimique d'un anion phénoxyde

L'activité antioxydante des polyphénols peut prendre plusieurs formes dans la régulation du stress oxydatif, vis-à-vis des effets délétères des radicaux libres. Ces composants peuvent intervenir en captant directement les radicaux libres ou en inhibant les enzymes responsables de la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou encore en captant les cations métalliques (BRAND WILLIAMS et *al.*, 1995).

1.4.1.2. Propriétés anti-inflammatoires

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir de la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire de manière spécifique, ils inhibent l'enzyme NOS (Oxyde nitrique synthase) responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est un déclencheur chimique de l'inflammation (LAHLAH, 2008). D'autres études, affirment l'action inhibitrice de ces flavonoïdes, plus particulièrement la lutéoline, l'apigénine, catéchine sur la cyclo-oxygénase, une enzyme synthétisant des molécules impliquées fortement dans le processus inflammatoire (GEROTTI, 2006).

1.4.1.3. Propriétés antifongiques et antibactériennes

Les propriétés antifongiques et antibactériennes semblent possibles via l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer (MILANE, 2004). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* sont focalisées sur l'évaluation des propriétés antibactériennes, et antifongiques des polyphénols. cet effet est démontré par de nombreuses recherches expérimentales :

-les stilbènes sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés antifongiques. Ils inhibent la germination de solutions de conidies de *Botrytis cinerea* (JEANDET et *al.*, 2002) ;

-d'après KATARZYNA et *al.* (2007) de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*...) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*...) ;

-les gallotannins ont une activité antibactérienne intense vis-à-vis des *Salmonelles* et *Bacillus cereus* (COLLIN et CROUZET, 2011).

1.4.1.4. Propriétés préventives des maladies cardiovasculaires

Les flavonols et les flavonoïdes sont à l'origine d'un effet cardioprotecteur via leurs effets antioxydants qui permettent une protection contre l'oxydation des LDL. Ces derniers étant l'un des facteurs clés du processus physiopathologique de l'athérosclérose. Ainsi les antioxydants limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribue à l'épaississement des parois et à la réduction du flux sanguin qui parvient au niveau des tissus, également par l'inhibition de l'activité plaquettaire et leurs propriétés vasodilatatrices (PRIOR et *al.*, 2001).

L'action protectrice de l'acide gallique serait également due à son action antioxydante (piégeage des radicaux libres) (PRISCILLA et *al.*, 2009). Le trans-resvératrol agit sur l'agrégation plaquettaire et la vasodilatation. En jouant sur le statut antioxydant, il régule par ailleurs l'expression génétique et mène à une diminution de la concentration totale en lipides (cholestérol et triglycérides) (DELMAS et *al.*, 2005).

1.4.2. Applications industrielles des composés phénoliques

Grace aux propriétés biologiques qu'ils possèdent, les composés polyphénoliques ont été exploitées et utilisées dans de nombreux domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique. Les propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavanols et les tanins, permettent de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (DAGLIA, 2012). La capacité antioxydante de composés comme les polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Les polyphénols sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés, d'arômes alimentaires, aussi ils rentrent dans la composition des produits pharmaceutiques et cosmétiques (MOURE et *al.*, 2001). Enfin, l'effet de certains flavonoïdes en médecine humaine est de plus en plus étudié dans le traitement de certaines maladies, et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, le principal responsable du SIDA (SARTORI-THIEL, 2003).

Chapitre II:

Présentation des coproduits agricoles

2.1. Propolis

2.1.1. Définition et Etymologie

La propolis, également appelée colle d'abeille, est une matrice complexe naturelle synthétisée par les abeilles à partir de produits collectés dans les bourgeons des arbres, les sucres, les résines, les mucilages, les treillis et autres sources végétales. Auxquelles s'ajoutent leurs propres sécrétions (cire et sécrétions salivaires principalement). Le mot propolis est dérivé de grec dans lequel « pro » signifie devant ou défense, et « polis » signifie la cité ", indiquant que ce produit naturel est utilisé dans la défense de la ruche (SFORCIN, 2016).

2.1.2. Historique de la propolis

Depuis des millénaires les Égyptiens, Grecs, Romains, Mayas utilisaient les produits issus de la ruche à des fins préventives, curatives et alimentaires. De 3200 à 1100 ans avant JC, la propolis avait un rôle religieux dans l'Égypte ancienne. Les Égyptiens utilisaient cette résine pour embaumer leurs cadavres. Dans la Grèce antique, la propolis était utilisée comme désinfectant et antiseptique pour les infections cutanées et buccales (CASTALDO et CAPASSO, 2002). En Rome Antique, les soldats romains, eux, partaient au combat avec un morceau de propolis pour cicatriser leurs futures plaies. En 460-377 avant JC., Hippocrate favorise l'utilisation de la propolis pour soigner les plaies externes et internes et ulcères (NAJAFI et *al.*, 2007).

En France, ce n'est qu'au début de 18^{ème} siècle que le terme de propolis apparaît dans les écrits d'Amboise (chirurgien d'Henri II, de François 1^{er}, de Charles IX ainsi que d'Henri III). A la fin de 19^{ème} siècle, on trouve quelques traces de son usage dans le traitement de plaies, mais c'est surtout à l'occasion de guerre de Bores en Afrique de sud qu'elle connaît son apogée d'utilisation grâce à ses propriétés désinfectantes et cicatrisantes (DONADIEU, 1981).

A La fin de 21^{ème} siècle, un important marché de propolis existe en Russie et en Allemagne, où la propolis est utilisée comme remède populaire pour soigner les maux et également comme anti-infectieux, cicatrisant, adoucissant et anti-inflammatoire.

De nos jours, le développement des recherches sur la propolis sont principalement liées au développement de la chimie et les méthodes analytiques qui ont permis d'analyser sa composition chimique (ZABAIUO, 2017).

2.1.3. Origine botanique de la propolis

La propolis est d'origine végétale. Elle provient de résines végétales émises par certains végétaux pour se protéger. Ces résines sont considérées comme des métabolites secondaires des plantes et peuvent avoir plusieurs fonctions en particulier la protection contre les pathogènes (champignons) et contre le froid.

L'analyse de la bibliographie met en évidence que la propolis peut avoir des origines différentes en fonction de la zone géographique de la ruche, de la flore botanique qui se situe à la proximité des ruches et aussi à l'espèce de l'abeille (préférence de l'abeille) (CARDINAULT et *al.*, 2012). Les principaux arbres connus pour être productrices de propolis sont essentiellement représentées par le prunier, frêne, chêne, orne (LAVIE, 1975), aulne (LAVIE, 1975; FRANCISCO et *al.*, 1993), bouleau, féverole et saule ainsi que des conifères (pin, sapin et épicéa) (METZNER et SCHNEIDEWIND, 1997) et plusieurs espèces de peuplier (qui semblent la source la plus importante).

Tableau II. Sources botaniques de la propolis selon les différentes régions (BANKOVA, 2002).

Espèce	Famille	Région géographique
Chêne	Fagacées	Asie
		Afrique
Peuplier	Salicacée	Afrique de Nord
		Moyen-Orient
		Europe
Bouleau Blanc	Bétulacée	Europe de Nord
		Amérique
		Canada
Orme	Ulmacées	Amérique
		Europe
		Chine
Pin	Pinacées	Amérique de Nord
		Europe de Nord
		Russie
Marronnier d'inde	Hippocastanacées	Europe
		Afrique
		Balkans

2.1.4. Récolte de la propolis

2.1.4.1. Récolte par l'abeille

La récolte de la propolis est faite par un nombre restreint d'abeilles les ouvrières butineuses (qui sont dans la dernière partie de leurs existences). La récolte dépend de nombreux facteurs :

- **facteurs saisonniers** : la récolte a lieu, soit au début de printemps soit le plus souvent à la fin de la miellée, ou à l'approche de l'automne (au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage) ;

-**facteurs géographiques** : il a été constaté que les ruches situées dans les régions boisées propolisent plus que les ruches de plaines ;

- **facteurs climatiques (la température)**: les abeilles récolteuses de propolis déploient leur activité au cours des journées chaudes (température supérieure à 20°C) et en particulier pendant les heures les mieux exposées à cette chaleur (soit entre 10 h et 15 h 30 en moyenne). Ceci est dû au fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires ;

- **facteurs liés à la race d'abeille**: il est reconnu que les caucasiennes (*Apis mellifera caucasia*) et certaines autres races d'Asie mineure (celle d'Anatolie centrale en particulier) propolisent, en général, davantage que les autres.

La récolte s'effectue comme suit :

- les ouvrières butineuses localisent la source de résine avec ses antennes ;

-les abeilles triturent les résines avec leurs mandibules, les mélangent à d'autres substances de leurs propres sécrétions afin de fabriquer la propolis ;

-une fois fabriquée, la propolis est transportée à la ruche dans les corbeilles situées dans les pattes postérieures de l'abeille (DONADIEU, 1981).

2.1.4.1. Récolte de la propolis par l'apiculteur

La propolis peut être récoltée selon deux techniques :

- raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche, de préférence à température assez basse. La propolis alors dure et friable se détache mieux ;

- utilisation de différents dispositifs: grille moulée en matière plastique ou en métal. Cette grille est posée comme couvre cadres. Les abeilles s'empressent d'obturer ces trous de propolis. Les déchets les plus grossiers sont éliminées et la propolis dissoute à froid dans l'alcool éthylique à 70% ce qui permet l'élimination de la cire (LAVIE, 1975).

2.1.5. Caractéristiques physico-chimiques de la propolis

La caractérisation physico-chimique de la propolis est très importante pour l'obtention

d'un produit de qualité standardisé pour répondre aux exigences du marché. La variation de ces caractéristiques peut être expliquée par la différence de la flore botanique à partir de laquelle la propolis est récoltée d'une région à une autre.

2.1.5.1. Caractéristiques physiques

- **Couleur** : elle varie selon sa provenance, allant de jaune claire au brun très foncé, presque noire en passant par toutes les gammes de brun (brun jaune, brun vert et brun rouge).
- **Saveur** : elle est souvent amère et âcre.
- **Odeur** : elle a une odeur variable suivant son origine botanique en général présente une arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille) lorsqu'on la brûle, elle dégage une odeur très délicate et recherchée du fait des résines aromatiques qu'elle contient (TOSI et *al.*, 2006) .
- **Consistance** : la propolis est une substance de consistance variable suivant la température :
 - à 15°C elle est dure et friable ;
 - à 30°C elle est molle malléable ;
 - entre 30°C et 60°C elle est collante et gluante ;
 - à 70°C et plus elle devient fondue.
- **Solubilité** : la propolis est insoluble dans l'eau froide, et partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme et éther. Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants. La partie insoluble de la propolis est présentée par les tissus végétaux, les grains de pollen, les débris de cuticule et la soie d'abeille.
- **Point de fusion** : il se situe vers 60 à 70°C en moyenne mais peut atteindre 100°C et plus.
- **Densité** : elle est de l'ordre de 1,2 en moyenne (TOSI et *al.*, 2006).

2.1.5.2. Composition chimique de la propolis

L'origine botanique dont sera issue la propolis constitue le principal facteur responsable de sa composition spécifique. L'autre facteur sera les modifications générées à travers les sécrétions hypopharyngiennes de l'abeille qui vont apporter d'autres éléments spécifiques en plus de certaines transformations (hydrolyse des hétérosides de flavonoïdes en aglycone) (CARDINAULT et *al.*, 2012). De manière générale, la propolis brute est constituée de 50 à 55 % de résines et baumes, de 30 % de cires et acides gras, de 10 %

d'huiles essentielles, de 5 % de pollen et de 5 % de substances organiques et minérales (BANKOVA, 2005). La liste des principales classes des composés chimiques de la propolis est illustrée dans le tableau suivant :

Tableau III. Composition chimique de la propolis (WATANABE et al., 2011)

Composition en ordre	Composants par groupe	Quantité (%)
Résines et baumes	Flavonoïdes, acides phénoliques et leurs esters, terpènes, aldéhydes, alcools aromatiques.	45 à 55%
Cire et acides gras	La cire d'abeille et des plantes	25 à 35%
Huiles essentiels volatiles	Anéthol, eugénol	10%
Pollen	Protéines	5%
Autres composés organiques et substances minérales	Cétones, lactones, quinones, stéroïdes, acides benzoïques vitamines A /B, sucres les minéraux (fer, calcium, zinc, cuivre, silice)	5%

Les constituants responsables de l'activité pharmacologique de la propolis sont :

- Flavonoïdes : Les flavonoïdes sont les principaux composés de la propolis, on dénombre plus de 60 flavonoïdes, parmi eux, il pourrait être trouvé flavones (lutéoline), flavonols (quercétines et dérivés), les flavanones (pinocembrine, ou 5,7 dihydroxyflavone, et dérivés, et naringénine), flavanonols (garbanzol et alnustinol), chalcones et dihydrochalcones, isoflavones, isodihydroflavones (daidzéine), flavanes, isoflavanes et les néoflavonoïdes (BANKOVA, 2005). Ce nombre important fait de la propolis une substance aux multiples propriétés biologiques (antioxydant, anti- inflammatoire...);
- acides phénoliques : sont principalement l'acide caféique, (fort pouvoir antioxydant), l'acide cinnamique (antiseptique et antifongique), l'acide et l'alcool benzoïque ainsi l'acide férulique (puissant antioxydant et anti-inflammatoire) ;
- les substances aromatiques : vanilline et isovanilline (PIETTA et al., 2002).

2.1.6. Propriétés biologiques de la propolis

2.1.6.1. Propriétés antioxydantes

La richesse de la propolis en flavonoïdes lui confère une propriété à piéger les radicaux libres, elle possède aussi d'autres composants responsables du pouvoir antioxydants comme l'acide caféique, l'acide caféoylquinique, l'acide cinnamique, et leurs dérivés, ainsi que la drupanine (COUSIN, 2014).

2.1.6.2. Propriétés anti –infectieuses

➤ Activité antimicrobienne

La propolis est un bactéricide efficace pour les germes comme *Staphylococcus (aureus et mutans)* des *Streptococcus (mutans et sanguinis)*, des *Bacilles (cereus et subtilis)*, des *Proteus (vulgaris et mirabilis)*, des *Pseudomonas (aeruginose)*, des *Listeria*, des *Salmonella*, des *Clostridium*, des *Pyogènes*, *Escherichia coli* et *Helicobacter pylori*. Les différentes études mécanistiques suggèrent que la propolis et/ou ses composés pourraient inhiber la croissance bactérienne par blocage de la division cellulaire, par une désorganisation du cytoplasme, par une inhibition de la synthèse protéique ou par une inhibition du processus d'adhésion (SCAZZOCCHIO et al., 2006 ; FAROOQUI T et FAROOQUI A, 2010).

➤ Activité antifongique

La propolis exerce une activité fongicide contre les germes appartenant au genre *Candida*, mais aussi contre les champignons de type *Aspergillus* (OZCAN, 2004) *Mycrosporium* (DOBROWOLSKI et al., 1991), ainsi que contre les levures (DALBEN- DOTA et al., 2010).

➤ Activité antivirale

Les études ont montré que la propolis et/ou ses constituants étaient efficaces contre de nombreux virus : myxovirus, poliovirus, coronavirus, rotavirus, adénovirus (SCHNITZLER et al., 2010).

➤ Activité antiparasitaire

Quelques études ont montré que la propolis était efficace contre les trichomonas, les trypanosoma (responsable de la maladie du sommeil) (DE CASTRO et al., 1995), la leishmania (MACHADO et al., 2007), *Giardia lamblia* (parasitose intestinale) (ABDEL- FATTAH et Nada , 2007).

2.1.6.3. Propriétés anti-inflammatoires

Les flavonoïdes de la propolis interviennent dans l'inhibition de l'activation de certaines molécules du système immunitaire (IL-6) et inhibition de certaines enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'inflammation (cyclo-oxygénase, lipo-oxygénase, myéloperoxidase, NADPH-oxydase, ornithine décarboxylase) (COUSIN, 2014).

2.1.6.4. Propriétés immunomodulatrices

La propolis stimule le pouvoir de présentation des macrophages, l'activité lytique des macrophages et des *natural killer* contre les cellules tumorales. Elle augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8), renforce la coopération entre les lymphocytes CD4 et CD8 et stimule la production d'anticorps par les plasmocytes (ORSI et al, 2000 ; SFORCIN, 2007).

2.1.6.5. Propriétés anticancéreuses

La propolis contient des substances cytotoxiques naturelles comme les flavanones, l'artépilline C et les diterpénoïdes qui déclenchent l'apoptose des cellules cancéreuses (GHARBI, 2011).

2.1.7. Utilisation de la propolis

2.1.7.1. Utilisation de la propolis par les abeilles

En raison de sa nature cireuse et ses propriétés mécaniques la propolis est utilisée par les abeilles comme ciment pour garder l'humidité et la température stables dans la ruche toute l'année, et sceller les fissures ou les espaces ouverts. Elle est employée aussi pour momifier les petits rongeurs morts à l'intérieure de la ruche pour éviter leur putréfaction (ZABAIYOU, 2017).

2.1.7.2. Utilisation de la propolis par l'homme

En cosmétique, la propolis et ses extraits ont été largement utilisés dans la dermatologie et la cosmétique en raison de ses effets sur la régénération des tissus. En médecine, la propolis est utilisée pour le traitement des problèmes cardio-vasculaires, appareil respiratoire, infections muqueuses et les lésions ainsi pour l'amélioration du système immunitaire.

En technologie alimentaire, les activités antioxydantes et anti-infectieuses de la propolis lui offre une place importante dans ce domaine. La propolis peut être utilisée comme

préservatif en matériel d'emballage de nourriture, elle peut également être utilisée pour la conservation de denrées alimentaires telle que la conservation des poissons (GHEDIRA et *al.*, 2009).

2.2. Les cladodes du figuier barbarie

2.2.1. Le figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*)

2.2.1.1. Historique

Le figuier de barbarie est une plante originaire du Mexique. Il était inconnu en Europe avant les voyages de Christophe Colomb et fut décrit de façon précise pour la première fois en 1535 par l'Espagnol Gonçalo Hernández de Oviedo y Valdés dans son « Histoire des Indes Occidentales ». Le figuier de barbarie est arrivé en Europe vers 1552, ramené par les Espagnols. Au début du seizième siècle, le figuier de barbarie s'étend sur le bassin méditerranéen suite aux expansions espagnoles et aussi par le retour des arabes à leur pays dans le nord-africain suite à leur expulsion par Philippe III en 1610. Les arabes ont ramené avec eux des raquettes qu'ils ont plantées autour de leurs villages. La plantation du figuier de barbarie a été considérablement étendue dans la région du sud de l'Afrique (1772), l'Inde (1780), les Philippines (1695), la Chine (1700) et l'Indochine (1790) (LE HOUEROU, 1996).

2.2.1.2. Définition

Les cactacées sont des plantes angiospermes dicotylédones dialypétales caliciflores de l'ordre des Caryophyllales qui renferment environ 1600 espèces (WALLACE et GIBSON, 1997). Elles font partie des plantes xérophytes et succulentes. Le genre *Opuntia* est le plus important et le plus répandu de la famille des cactacées. Il comprend environ 300 espèces réparties en quatre sous-genres dont trois sont très abondants en Algérie : *Brasiliopuntia*, *Cylindropuntia* et *Platyopuntia* (ARBA, 2002). L'*Opuntia ficus indica* est plus connu sous le nom de figuier de barbarie (HABIBI, 2004).

Le figuier de Barbarie est une plante arborescente résistante de 3 à 5 m de haut, constituée d'un tronc épais et ligneux et une organisation en articles aplatis, de forme elliptique ou ovoïdale de couleur vert, de longueur qui varie de 30 à 50 cm, une largeur de 15 à 30 cm et une épaisseur de 1.5 à 3 cm appelés cladodes ou raquettes. Il existe deux variétés de figuier barbarie, la variété inerme et la variété épineuse. (REYES-AGUIRO et *al.*, 2006 ; NEFFAR, 2012).

2.2.1.3. Classification

La position systématique du figuier de barbarie est donnée dans le tableau ci-dessous

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Caryophyllidae</i>
Ordre	<i>Caryophyllales</i>
Famille	<i>Cactaceae</i>
Sous-famille	<i>Opuntioideae</i>
Tribu	<i>Opuntieae</i>
Genre	<i>Opuntia</i>
Sous-genre	<i>Platyopuntia</i>
Espèce	<i>Opuntia ficus indica</i>

Nom commun :

Figuier de Barbarie

Nom latin : *Opuntia*

ficus-indica

2.2.1.4. Origine et distribution géographique d'*Opuntia ficus indica*

Le genre *Opuntia* est originaire du Mexique (ORWA et al., 2009). Sa distribution géographique est très large : Mexique, Sicile, Chili, Brésil, Turquie, Corée, Argentine et Afrique du Nord (BARBERA et al, 1992 ; NERD et MIZRAHI, 1994). Il a été introduit d'abord en Espagne et plus tard au 16^{ème} siècle au Nord et au Sud de l'Afrique. Il s'est diffusé rapidement dans le bassin méditerranéen et s'y est naturalisé au point de devenir un élément caractéristique du paysage (LE HOUEROU, 1996). Il est par essence développé sur la partie Ouest de la Méditerranée : Sud de l'Espagne, le Portugal, et l'Afrique du Nord (Tunisie, Algérie et Maroc) (ARBA, 2006).

2.2.1.5. Exigences écologiques

Le genre *Opuntia* est xérophyte (GIBSON et NOBEL, 1986). Il croit principalement dans les zones arides et semi-arides. Sa remarquable variabilité génétique lui procure une forte adaptabilité écologique, ce qui lui permet de vivre sous différentes conditions climatiques (STINTZING et CARLE, 2004). Il croit dans les plaines, les régions côtières et les plateaux (LAHSASNI et al., 2004). Il craint les fortes gelées et peut supporter des températures

minimales jusqu'à -10°C pour quelques heures. Cette tolérance dépend de la turgidité du tissu chlorenchymateux des cladodes (SAENZ et *al.*, 2004). Les températures maximales supportées excèdent les 50 à 58°C . Bien que cette espèce ait une large faculté d'adaptation pour différents sols (acides, calcaires ou pauvres en matière organique), elle a une préférence pour les sols très perméables, sableux ou caillouteux (NERD et *al.*, 1991).

2.2.2. Les cladodes du figuier de barbarie

Les cladodes représentent le tronc épais et ligneux qui caractérise la plante de figuier de barbarie. Ces derniers sont des articles aplatis en forme de raquettes de couleur vert mat, ayant une longueur de 30 à 50 cm et une largeur de 15 à 30 cm. Les cladodes de figuier de barbarie assurent la fonction chlorophyllienne et sont recouvertes d'une cuticule cireuse (la cutine) qui limite la transpiration et les protège contre les prédateurs. Les feuilles sont de forme conique et ont quelques millimètres de long, éphémères, apparaissant sur les cladodes jeunes. A leur base, se trouvent les aréoles (environ 150 par cladodes) qui sont des bourgeons axillaires modifiés, typiques des Cactacées. Leurs méristèmes produisent des épines, des glochides, des racines adventives, de nouvelles cladodes ou des fleurs. Les épines sont blanchâtres, sclérifiées, solidement implantées et longues de 1 à 2 cm (SUTTON et *al.*, 1981).

2.2.2.1. Morphologie

Les raquettes du cactus sont composées d'un parenchyme blanc (tissu de base) et le contenant de la chlorophylle au sein du chlorenchyme (tissu de cortex). Ce dernier est recouvert d'épines (feuilles modifiées) et poils ou trichomes multicellulaires, qui forment l'aréole et qui est une caractéristique des membres de la famille des cactacées (ANDERSON, 2001). Les glochides sont composées de 100% de cellulose cristalline. Les micro fibrilles de cellulose sont de $0,4$ mm de longueur et de 6 à 10 μm en diamètre, et sont parallèlement ancrées dans une matrice d'arabinose. Celle-ci est en présente sous forme de gel solide, tissé et serré avec la cellulose. Les épines sont constituées de 96% de polysaccharides, qui eux-mêmes sont divisés en $49,7\%$ de cellulose et $50,3\%$ d'arabinose, le reste est constitué de cendres, matières grasses, cires et la lignine (MALAININE et *al.*, 2003). Elles mesurent 1 à 3 cm de longueur et forment $8,4\%$ du poids total de cladode (ANDERSON, 2001).

2.2.2.2. Composition chimique

La composition chimique des cladodes varie en fonction des facteurs édaphiques, l'endroit de la culture, la saison et l'âge de la plante. Par conséquent, les teneurs en éléments nutritifs respectifs varient à la fois entre les espèces et les variétés et ils ne devraient pas être pris comme des valeurs absolues (STINTZING et CARLE, 2005).

Les jeunes cladodes ont des valeurs élevées en glucides, en protéines, et la teneur en eau. Les cladodes ont une haute teneur en calcium et en fibres. La teneur en eau varie entre 88 à 95%, elle donne aux cladodes une valeur alimentaire en étant pauvre en calories (27 kcal /100 g) (STINTZING et CARLE, 2005). Les Différents constituants des cladodes du figuier de barbarie sont :

- **Minéraux**

Le potassium est le principal minéral, il occupe 60% de la teneur totale en cendres (166 mg /100 g de poids frais), suivie par le calcium (93 mg /100 g de poids frais), sodium (2 mg /100 g de poids frais) et le fer (1,6 mg/100 g de poids frais) tandis que le magnésium n'a pas été détecté (MUNOZ DE CHAVES et *al.*, 1995).

- **Glucides**

Les glucides constituent un total de 36% à 37% de l'ensemble du poids sec des cladodes. La teneur en glucides est comprise entre 64 et 71 g /100 g par rapport au poids sec. Les jeunes cladodes sont plus riches en glucides (GINESTRA et *al.*, 2009).

- **Acides organiques**

L'acide malonique et l'acide citrique représentent respectivement 36 et 178 mg /100g de poids frais. En revanche, les cladodes âgées ne contiennent plus d'acide malonique. L'acide tartrique et succinique ont été trouvés seulement en état de traces (TELES et *al.*, 1987).

- **Acides aminés**

Il existe 18 acides aminés compris dans les cladodes du figuier de barbarie (BRUCKNER et *al.*, 2003). La teneur en protéines est de 11g /100 g de poids frais ou de 0,5 g/100 de poids sec (TELES et *al.*, 1997). Les principaux acides aminés sont la glutamine, suivie par la leucine, la lysine, la valine, l'arginine, la phénylalanine et l'isoleucine (EL- MOSTAFA et *al.*, 2014).

- **Acides gras**

L'acide oléique, l'acide palmitique, l'acide linoléique et l'acide linoléique représentent plus

de 90% des acides gras totaux. Les acides linoléiques et linoléiques constituent les principaux acides gras polyinsaturés (67,7%) (ABIDI *et al.*, 2009).

- **Vitamines, caroténoïdes et chlorophylles**

La teneur totale de la vitamine C (acide ascorbique et déhydroascorbique) dans 100 g de matière fraîche s'élève à 22 mg, b-carotène à de 11,3 à 53,5 µg, thiamine à 0,14 mg, riboflavine à 0,6 mg et niacine à 0,46 mg (MOHAMMER *et al.*, 2006).

- **Composants phénoliques**

Parmi les acides phénoliques qui ont été détectés on peut citer l'acide ferulique, l'acide p- Coumarique, l'acide 4-Hydroxybenzoïque, l'acide caféique, l'acide salicylique, et l'acide gallique. Les flavonoïdes détectés sont la rutine, l'iso-quercitrine, la nicotiflorine et la narcissine (GUEVARA- FIGUEROA *et al.*, 2010).

Tableau IV. Composition en polyphénols des cladodes du *l'Opuntia ficus-indica* (EL- MOSTAFA *et al.*, 2014).

Polyphénols	Matière sèche (mg/100mg)
Acide gallique	0,64-2, 37
Coumarique	14,08-16,18
3,4- dihydroxybenzoïques	0,06-5,02
4-hydroxybenzoïques	0,5-4,72
Acide férulique	0,56-34,77
Isoquercetine	2,29-39,67
Isorhamnetin-O-glucide	4,59-32,21
Nicotiflorine	2,89-146,5
Rutine	2,36-26,17
Narcissine	14,69-137,1

2.2.2.3. Utilisation des cladodes

- **Production fourragère**

Les cactus sont considérés comme une réserve fourragère importante ; ils peuvent constituer un support alimentaire très bénéfique pour les périodes de transition essentiellement en été et durant les années de sècheresse.

- **Applications pharmaceutiques et cosmétiques**

Les cladodes du figuier de barbarie sont utilisées en médecine populaire, pour traiter la gastrite, la fatigue, la dyspnée et des maladies hépatiques dues à l'abus d'alcool (STINTZING et CARLE, 2005). Les cladodes chauffées s'avèrent très efficaces contre le rhumatisme, les érythèmes et les infections chroniques de la peau, mais également pour faciliter la digestion (MUNOZ DE CHAVEZ *et al.*, 1995). Le mucilage des cladodes est

utilisé en cosmétique pour la fabrication des shampoings, des assouplissants des cheveux, des crèmes hydratantes (FERNANDEZ *et al.*, 1990).

- **Production en agroalimentaire**

Traditionnellement, les cladodes du figuier de barbarie contribuaient de manière importante à l'alimentation humaine. Les principaux produits élaborés sont les cladodes au vinaigre, les cladodes en saumure, la confiture de cladodes, les cladodes confites et les frites de cladodes (ARBA, 2009).

- **Production de carmin**

Le carmin est un colorant naturel de couleur rouge carmin. Il est très recherché par les industries alimentaires et cosmétiques pour ses caractères biochimiques (PIMIENBARRIOS, 1994). Il est produit par l'élevage des cochenilles *Dactylopius coccus* et *Dactylopius opuntiae* qui sont des insectes hôtes du cactus.

2.2.2.4. Activités

biologiques

Opuntia ficus indica est une espèce qui appartient depuis son apparition aux plantes médicinales les plus utilisées. La recherche médicale actuelle redécouvre avec un intérêt grandissant la plante et ses propriétés biologiques.

- Le figuier de barbarie contient des biomolécules bioactives appelées bétacyanines (une catégorie de pigments rougeâtres) qui possèdent des propriétés antioxydantes et anticancéreuses et peuvent par conséquent servir de traitement naturel.
- Les fleurs et l'extrait de *Opuntia ficus indica* exercent des effets anti-inflammatoires sur l'organisme.
- Un effet analgésique contre les douleurs gastro-intestinales, l'angoisse, l'artériosclérose, la spasmophilie, le stress, les allergies et les brûlures.
- Antidiabétique, efficace contre l'obésité en empêche l'assimilation des sucres et des graisses dans l'organisme
- Activité antimicrobienne : l'extrait de raquettes du cactus est efficace dans la protection contre la génotoxicité de la zéaralénone (mycotoxine produite par *Fusarium graminearum*) (FERNANDEZ *et al.*, 1990).

2.3. Grignons d'olives

Les grignons d'olives sont des résidus de l'extraction d'huile d'olives entières broyées

et pressées ou centrifugées. Ils referment un agrégat de pulpes, de coques, de pellicules de fruits, de noyaux fragmentés (MARTIN-GARCIA *et al.*, 2003).

2.3.1. Méthodes d'obtention des grignons d'olives

Après la récolte, les olives sont triturées. Les tourteaux sont soit pressées, soit centrifugées afin d'extraire une phase liquide contenant l'huile. La phase solide restante appelée grignon et dont la part pondérale est de l'ordre d'un tiers, est un déchet. La phase liquide est fractionnée entre l'huile vierge et un déchet liquide, les margines (SEBBAN *et al.*, 2004).

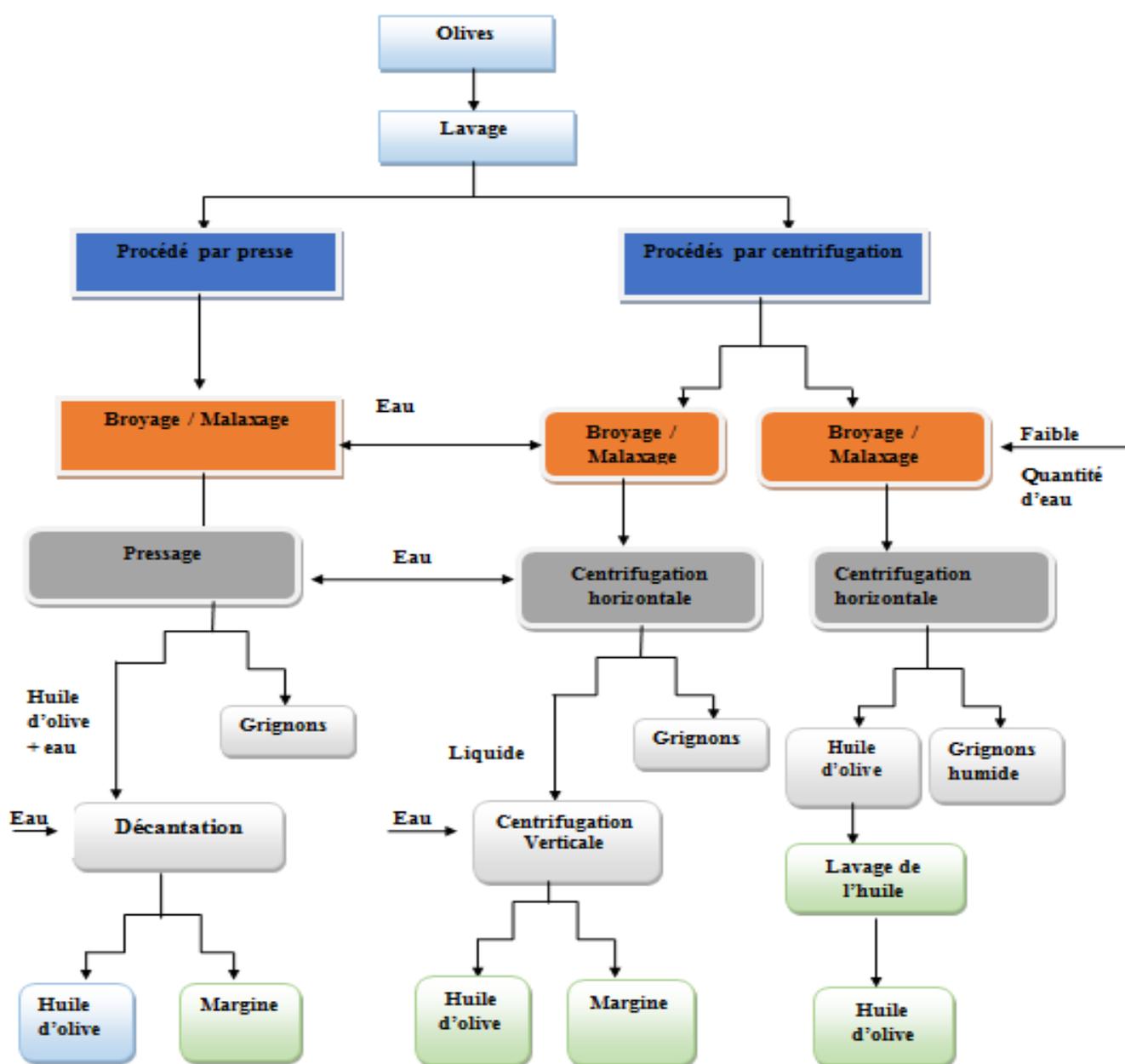


Figure 8. Méthodes d'extraction de l'huile d'olive par les systèmes discontinu et continu (VLYSSIDES et al, 2004 ; DERMECHE et al, 2013)

2.3.2. Caractéristiques chimiques des grignons d'olives

La composition chimique des grignons d'olives varie selon divers facteurs intrinsèques (variétés, stade de maturité...) et extrinsèques (procédé d'extraction par solvant ou sans solvant) (NEFZAOU, 1985).

Tableau V. Caractéristiques des grignons d'olives bruts issus de divers procédés d'extraction de l'huile (NEFZAOU et al., 1985).

paramètre	Extraction par pressage	Système continu à	
		3 phases	2 phases
Humidité %	27,2	50,23	56,8
Huile %	8,72	3,89	4,65
Protéine%	4,77	3,43	2,87
Sucre totaux %	1,38	0,99	0,83
Cellulose %	24,1	17,37	15,54
Hémicellulose %	11	7,92	6,63
Cendre %	2,36	1,7	1,42
Lignine%	14,1	10,21	8,54
Azote%	0,71	0,51	0,43
Phosphore P2O5	0,07	0,05	0,04
Composés phénolique %	1,14	0,326	2,43
Potassium K2O %	0,54	0,39	0,32
Carbone total %	42,9	29,03	25,37

Le grignon d'olive est caractérisé par des teneurs élevés en eau, cellulose, hémicellulose et en corps gras. Ils sont assez pauvres en protéines, minéraux et les carbohydrates solubles.

Tableau VI. Les composants minéraux de grignon brut ainsi que leurs teneurs respectives (%) (PERRIN, 1992).

KO	NaO	MgO	CaO	Fe	PO	SO	CU	Zn	Mn
12.4	0.4	1.2	8.5	1.9	2.7	1.3	0.44	0.33	1.08

2.3.3. Composés phénoliques des grignons

Les noyaux et les graines d'olives contiennent une quantité très considérable de polyphénols. Le composé phénolique majeur des graines d'olives est le nuzhénide, suivi du verbascoside également retrouvé dans la pulpe (RYAN et *al.*, 2003). Le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont retrouvés dans

les noyaux d'olives tandis que la décarboxyméthyl oleuropéine a été extraite à partir de la pulpe, les graines et les noyaux d'olives (FERNANDEZ-BOLÁNOS et *al.*, 1998). Les polyphénols majoritaires dans les grignons humides sont le tyrosol et l'hydroxytyrosol (FERNANDEZ- BOLÁNOS et *al.*, 2002) ainsi que l'acide p-coumarique. A un degré moindre, l'acide vanillique est également présent dans ce sous-produit. La rutine, l'acide caféoylquinique, la lutéoline-4- glucoside, la lutéoline-7-rutinoside et l'oléoside sont également des composés mineurs qui ont été détectés (LESAGE-MEESEN et *al.*, 2001).

2.3.4. Utilisation des grignons d'olives

La composition chimique des grignons d'olives et le fort tonnage rejet constituent une pollution pour des régions fragiles, incompatible avec le principe du développement durable. Actuellement beaucoup des débauches se présentent notamment dans les pays développés pour limiter l'effet polluant des grignons d'olives. Ils peuvent être également valorisés et employés pour la production de certains composants de valeur ajoutée (SEBBAN et *al.*, 2004).

2.3.4.1. Extraction de l'huile des grignons

L'huile des grignons est obtenue par traitement aux solvants ou d'autres procédés physiques. Elle est destinée au raffinage en vue de son utilisation dans l'alimentation humaine ou destinée à des usages techniques (HAMDI et ELLOUZ, 1993).

2.3.4.2. Alimentation du bétail

Les grignons d'olives, vu leur nature hautement lignocellulosique ont une dégradabilité très lente et les valeurs maximales atteintes sont très modestes (32% de la matière sèche est dégradée après une durée de séjour de 72 h dans le rumen). La dégradabilité des protéines est aussi très faible, et cela peut s'expliquer par le fait que 75 à 90% de l'azote est lié à la fraction lignocellulosique entraînant ainsi une très faible

solubilité de l'azote qui n'est que de 2.3% pour les grignons bruts, et de l'ordre de 0,2 à 0,4% pour les grignons tamisés. (SEBBAN *et al.*, 2004).

2.3.4.3. Biocombustible

Avec un pouvoir calorifique de l'ordre de 3500 kcal /kg, les grignons sont utilisés comme combustibles, pour alimenter en énergie les secteurs oléicoles et d'autres secteurs. Cette quantité de chaleur est apportée principalement par la coque qui a un pouvoir calorifique relativement élevé (4000 kcal /kg) contrairement à la pulpe qui apporte peu de calories (1400 kcal/kg) (NEFZAOU, 1988).

2.3.4.4. Charbon actif

Les grignons d'olives peuvent être valorisés en les transformant, par voie thermochimique, en charbon actif et cela en utilisant de l'acide phosphorique comme agent d'activation. L'avantage de l'activation chimique est d'opérer à des températures faibles et des temps de séjours courts. Plus récemment, la préparation des charbons actifs de bonne qualité et développant une structure poreuse importante avec des grandes surfaces spécifiques à partir des matériaux lignocellulosiques a été rapportée par OUNAS *et al.* (2009).

2.3.4.5. Compostage

Le compostage est la méthode la plus utilisée pour la préparation des amendements organiques et pour la fertilisation des sols. Il permet de détoxifier les résidus solides des grignons contenant des substances phytotoxiques et antimicrobiennes tels que les phénols, des acides gras et des acides organiques par dégradation aéro-anaérobie. Il convient souvent pour le compostage efficace des grignons d'ajouter d'autres déchets végétaux à savoir les

feuilles, la biomasse de taille d'olivier, les margines et les pailles de céréales (ZAIDI *et al.*, 2009).

2.3.4.6. Ingrédients des matériaux de construction

L'usage des grignons d'olives dans la fabrication de la brique constitue une percée intéressante à plusieurs points de vue ; il diminue la masse volumique des briques ce qu'il les rend plus légères. Il crée aussi des pores dans le but d'économiser l'énergie car leur présence dans les matériaux contribue à diminuer la conductivité thermique et augmente

ainsi son pouvoir d'isolation (OUNAS *et al.*, 2009).

2.3.5. Amélioration de la valeur alimentaire des grignons d'olives

Plusieurs procédés ont été étudiés pour améliorer la valeur nutritive des grignons d'olives : mécaniques ou physiques, chimiques, et biologiques. Le but de ces traitements est d'augmenter l'acceptabilité du produit par l'animal.

2.3.5.1. Traitements physiques

- Le broyage consiste à diminuer la taille des particules et qui est souvent suivie par l'agglomération. Ces deux opérations augmentent l'ingestion de 45% chez les ovins et 11% chez les bovins et diminuer la digestibilité de la matière sèche.
- Le tamisage consiste à éliminer le maximum de débris de noyaux. Ceci a pour effet de réduire notablement le taux de cellulose brute et de lignine et l'augmentation du contenu cellulaire, les études effectuées ont montré l'action bénéfique de ce traitement qui double à lui seul la digestibilité de la matière organique et de la matière azotée totale (NEFZAOU, 1988).

2.3.5.2. Traitements chimiques

Selon AGUILERA *et al.* (1986), le traitement à la soude suivi d'ensilage était le procédé le plus approprié pour améliorer la valeur nutritive du grignon d'olive. Le traitement à la soude est efficace à la chaleur et nécessite au moins 40 g de réactif par kg de produit. Une étape de neutralisation est nécessaire pour éliminer l'excès d'alcalis.

2.3.5.3. Traitements biologiques

- **Ensilage des grignons tamisés avec des fientes de volaille**

La technique d'ensilage permet de préserver la qualité nutritionnelle des grignons à condition d'avoir une humidité adéquate dans les silos (45% à 55%). Les essais montrent que des ensilages comportant 70% de fientes ayant été accumulé pendant moins de 21 jours et 30% de grignons tamisés épuisés se conservaient de façon excellente (NEFZAOU *et al.*, 1988).

2.3.5.4. Traitements enzymatiques

Dans le but de modifier la structure des fibres et améliorer la qualité sensorielle du grignon d'olive pour son incorporation dans un produit de boulangerie, des

préparations commerciales d'enzymes ont été utilisées : Viscoenzyme L, un complexe multi-enzymatique (hemicellulase/ cellulase et Olivex) qui présentent principalement des activités pectinolytiques aussi bien que plusieurs activités secondaires, hemicellulases et cellulases. Des expériences de cuite de pain ont montré que la substitution de 10% de la farine de blé par grignon d'olive modifié par voie enzymatique, a conduit à une texture améliorée, comparée aux produits contenant un grignon non traité) (ZAIDI et *al.*, 2009).



Partie II : Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

Le travail expérimental de ce mémoire a été effectué au sein du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) à l'université de Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou (UMMTO), durant la période comprise entre avril et juin de l'année 2018. L'objectif de cette présente étude est l'évaluation de quelques activités biologiques des composés phénoliques provenant des coproduits végétaux en vue de leurs valorisation.

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel biologique

1.1.1.1. La propolis

La propolis utilisée dans cette étude provient du village Sidi Khaled de la région de Tizirt situé dans le nord Algérien. Elle a été récoltée par la race d'abeilles *Apis mellifica* ou l'origine botanique est représentée principalement par le peuplier. La récolte par l'apiculteur a été effectuée en mois d'octobre 2017 par l'utilisation de grilles de propolis suivie d'une élimination des impuretés par dissociation dans l'alcool éthylique à 70%.



Figure 9. Photographie de la propolis de la région de Tizirt

1.1.1.2. Les cladodes du figuier de barbarie

Les raquettes de la plante *Opuntia ficus indica* utilisées dans cette étude ont été récoltées dans la région de Tizirt, une localité située à quarante km de la wilaya de Tizi Ouzou, en mois de mars 2018.



Figure 10. Raquettes d'*Opuntia ficus indica* à l'état frais

1.1.1.3. Les grignons d'olives

Les grignons d'olives utilisés dans la présente étude sont récupérés à partir d'une huilerie semi-moderne utilisant un système d'extraction de l'huile d'olive par presse, de la région d'Aït Yenni, wilaya de Tizi-Ouzou en mois de décembre 2017. Après leur récupération, les grignons d'olives ont été congelés à -18°C jusqu'à utilisation.



Figure11. Photographie des grignons d'olives

1.1.2. Appareils

Tableau VII. Appareillage utilisé lors du travail expérimental

Appareil	Référence	Appareil	Référence
Spectrophotomètre UV-visible	MEDLINE scientificlimited	Balance de précision	Kern, sartorius
Centrifugeuse Réfrigérée	SIGMA 4-16K	Balance	Denever instrument
Bain marie	Memmert	Vortex	VELP scientifica, Heidolph
Autoclave	Pbinternational	Agitateur magnétique	Labinco, Variomag poly 15 NETEZ
Etuve 37°C et 105°C	Binder, Memmert	Congélateurs	ENIEM
Four à moufle	NABERTHERM Controller B170	Réfrigérateurs	MAXIPOWER
pH mètre	INOLAB HANNA instrument	Rotavapor	Stuart

➤ **Consommable**

-Plaques CCM gel de silice, verrerie, micropipettes, micro-seringues, papier Watman, filtres, disques d'antibiotiques (novobiocine).

1.1.3. Produits chimiques et milieux de cultures utilisés

Tableau VIII. Tableau représentant les produits chimiques, réactifs, solvants organiques, sels et milieux de culture utilisés.

Produits chimiques et réactifs	DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS(2,2-azini-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), ferrocyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$), persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), TCA(acide trichloroacétique, chlorure de fer ($FeCl_3$), folin-ciocalteu, acide gallique, acide ascorbique, acide p-coumarique, acide cinnamique, acide caféique
Solvants organiques	Acétate d'éthyle, éthanol, chloroforme, acide formique, méthanol
Sels	Chlorure de sodium (NaCl), carbonate de sodium (Na_2CO_3), phosphate dissodique Na_2HPO_4 , phosphate dipotassium K_2HPO_4 .
Milieux de culture	BHIB (Brain Heart Infusion Broth), Gélose nutritive (GN), Mueller Hinton Agar (MHA)

1.2. Méthodes

1.2.1. Caractérisation physico-chimique des coproduits végétaux (grignons d'olives, propolis, cladodes du figuier de barbarie)

Plusieurs méthodes physicochimiques ont été employées pour caractériser les coproduits étudiés (propolis, grignons d'olives, cladodes du figuier de barbarie). Deux essais ont été réalisés pour chaque test.

1.2.1.1. Détermination de la teneur en eau et de la matière sèche totale

C'est la quantité d'eau exprimée en pourcentage contenue dans un composé liquide ou solide.

Mode opératoire

Des capsules vides ont été séchées à l'étuve durant 15min à $103 \pm 2^\circ\text{C}$, puis tarées après refroidissement dans un dessiccateur. Une quantité de 10g (cladodes du figuier de barbarie, grignons d'olives) ou 1g de propolis est placée dans chaque capsule, ensuite mise dans une étuve réglée à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3heures. Après refroidissement des capsules, une étape de pesé a été effectuée.

L'opération est répétée jusqu'à obtention d'un poids constant (on réduisant la durée de séchage à 30min pour éviter la caramélisation).

- La teneur en eau est déterminée par la formule suivante :

$$\mathbf{H\% = \frac{M1 - M2}{p} \times 100}$$

- M1 : représente la masse en grammes de la prise d'essai avant séchage.
- M2 : représente la masse en grammes de la prise d'essai après séchage
- P : la masse de la prise d'essai en g

La matière sèche totale est le résidu sec restant après séchage à 105°C . Elle comprend à la fois les matières en suspension et les résidus dissouts. Elle est exprimée par la formule ci-dessous :

$$\mathbf{\text{Matière sèche\%} = 100 - H\%}$$

1.2.1.2. Teneur en cendre et en matière organique

Pour les cladodes du figuier de barbarie et les grignons d'olives la teneur en cendre est déterminée par incinération de la matière sèche obtenue à 550°C dans un four à moufle pendant 5h. La teneur en cendre de la propolis a été déterminée par incinération de 2g de la matière brute.

Mode opératoire

Les échantillons ont été placés dans des capsules en porcelaine, puis mis dans un four à moufle réglé à $550^\circ\text{C} \pm 15^\circ\text{C}$ pendant 5h jusqu'à obtention d'une couleur grise, claire ou blanchâtre. Après refroidissement une étape de pesée a été effectuée.

La teneur en matière organique est calculée comme suit :

$$\mathbf{MO \% = \frac{M1 - M2}{p} \times 100}$$

MO : matière organique

M1 : masse des capsules + prise d'essais

M2 : masse des capsules + cendre

P : la masse de prise d'essais

La teneur en cendre représente la fraction minérale des coproduits végétaux. Elle est donnée par la formule suivante:

$$Tc\% = 100 - MO\%$$

Tc : teneur en cendre

1.2.1.3. Détermination du pH

Mode opératoire

Un volume de 100ml de l'eau distillé est ajouté à 4g de l'échantillon (propolis, grignons d'olives, cladodes du figuier de barbarie). Le mélange est chauffé au bain- marrie pendant 30 mn. La détermination de pH a été effectuée à l'aide d'un pH mètre après une étape de filtration.

1.2.2. Extraction des composés phénoliques

Il s'agit d'une extraction solide –liquide, le principe de cette extraction consiste en ce que le solvant organique doit franchir la barrière de l'interface solide –liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieure du solide et l'entraîner à l'extérieure. Le choix du solvant à utiliser dépend de la nature des composés à extraire, de leurs solubilités dans le solvant et surtout de la nature du matériel végétal. Dans cette présente étude deux solvants organiques de polarités déférentes (l'acétate d'éthyle et éthanol 96%) ont été utilisés.

1.2.2.1. Grignons d'olives

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée en ajoutant à 100g de grignons d'olives concassés dans 200 ml de l'acétate d'éthyle ou éthanol (p/v). Après agitation pendant 2h, une filtration avec du papier filtre est effectuée. Le filtrat est soumis à une centrifugation à 4000g pendant 15 min. L'extrait phénolique (surnageant) obtenu est séparé du solvant par évaporation sous vide au rotavapor. Cet extrait sec est récupéré dans 4ml de l'éthanol puis conservé dans des tubes fermés, au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation.

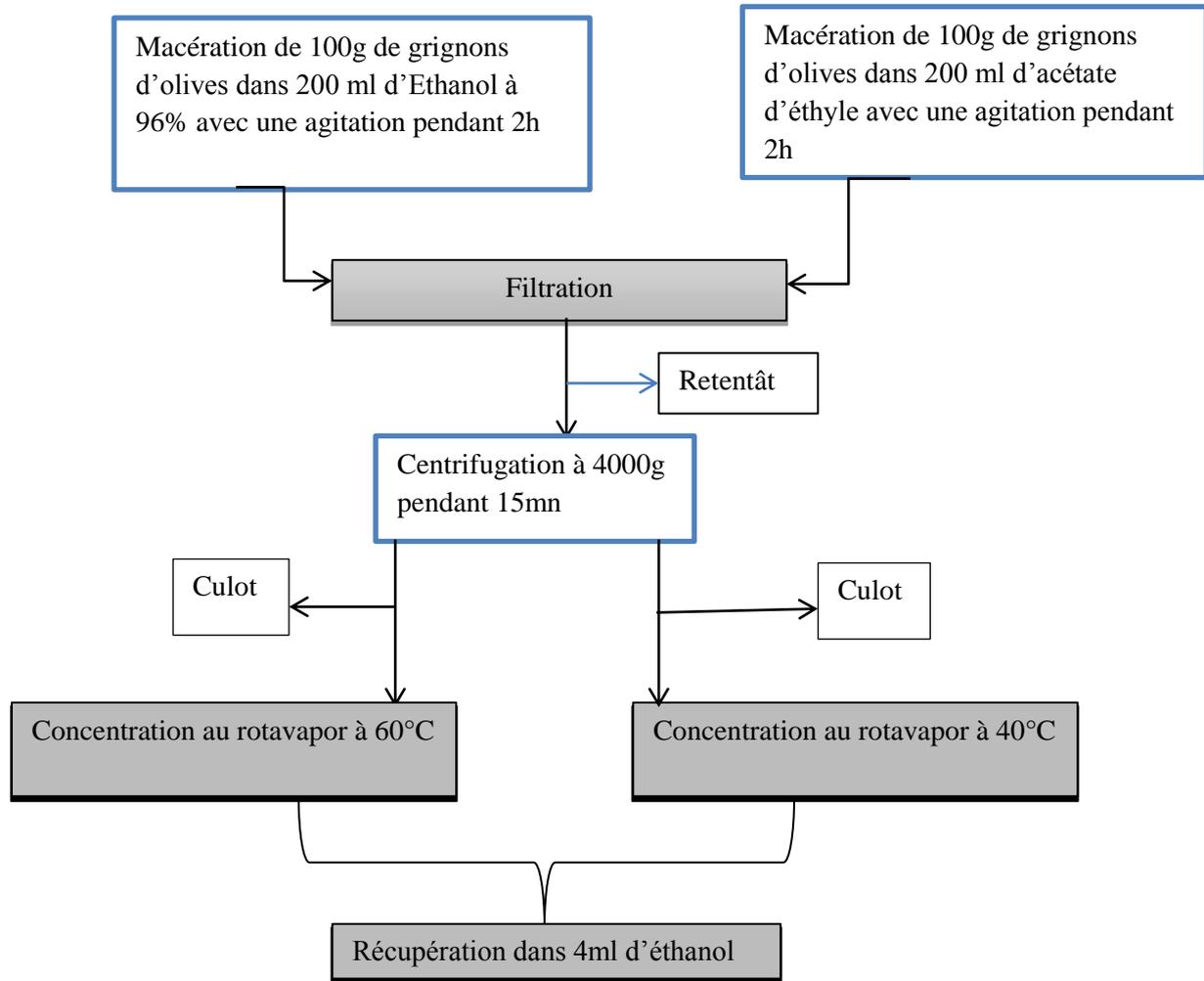


Figure 12. Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir des grignons d'olives en utilisant deux solvants organiques (acétate d'éthyle et éthanol).

1.2.2.2. Propolis

L'extraction des composés phénoliques contenus dans la propolis consiste à mélanger 10 g de propolis avec 10 ml de solvant (acétate d'éthyle et l'éthanol). Toutes les solutions sont agitées pendant 24 h à température ambiante (15-20 ° C). Après centrifugation à 4000 g pendant 10 minutes, le surnageant est récupéré et filtré à papier filtre. Le filtrat subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif. L'extrait sec est récupéré dans un volume minimum d'éthanol (4ml), cet extrait éthanoïque est conservé dans des tubes fermés, au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation.

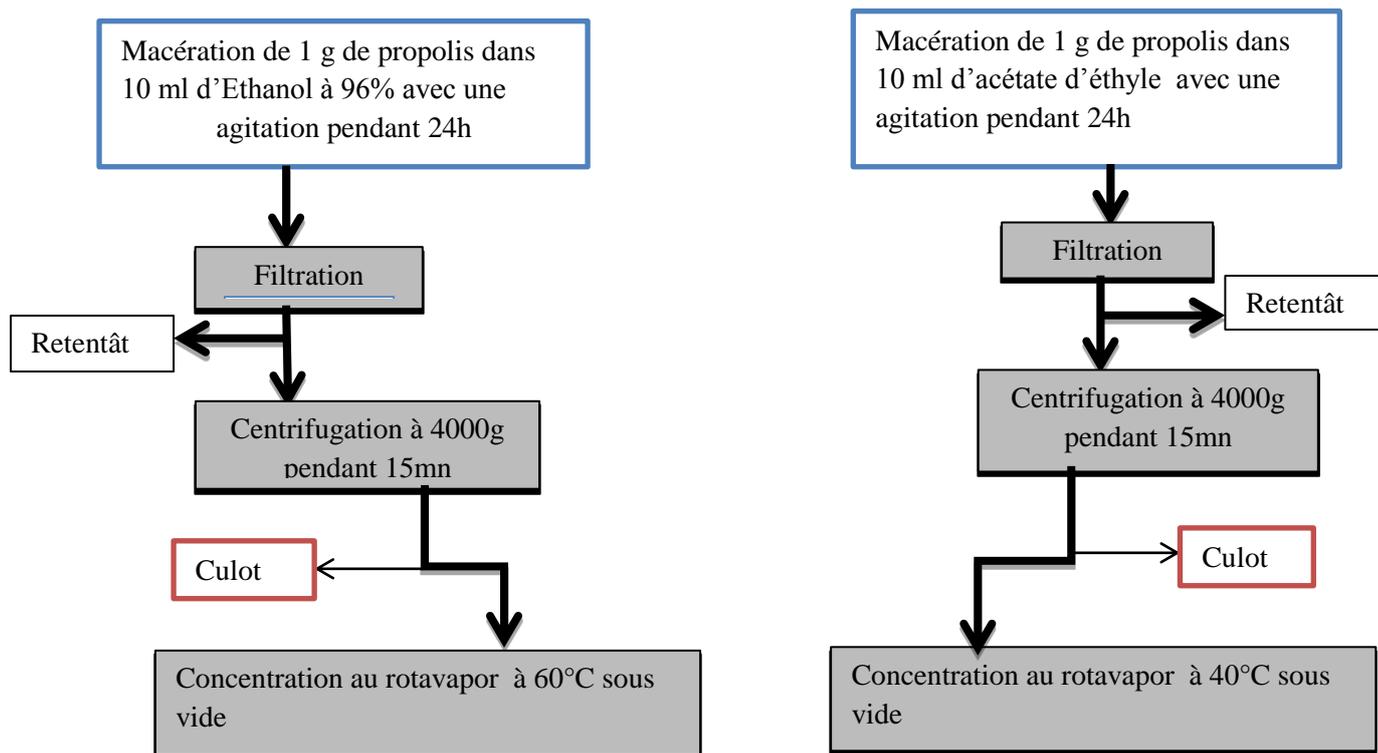


Figure 13. Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir de la propolis en utilisant deux solvants organiques (acétate d'éthyle et éthanol).

1.2.2.3. Cladodes du figuier de barbarie

L'extraction des composés phénoliques se fait en ajoutant à 100g de l'échantillon un solvant organique polaire qui est l'éthanol à 96% ou l'acétate d'éthyle avec un volume de 100ml et en laissant le mélange sous agitation pendant 2h suivie d'une filtration, centrifugation puis d'une concentration au rotavapor.

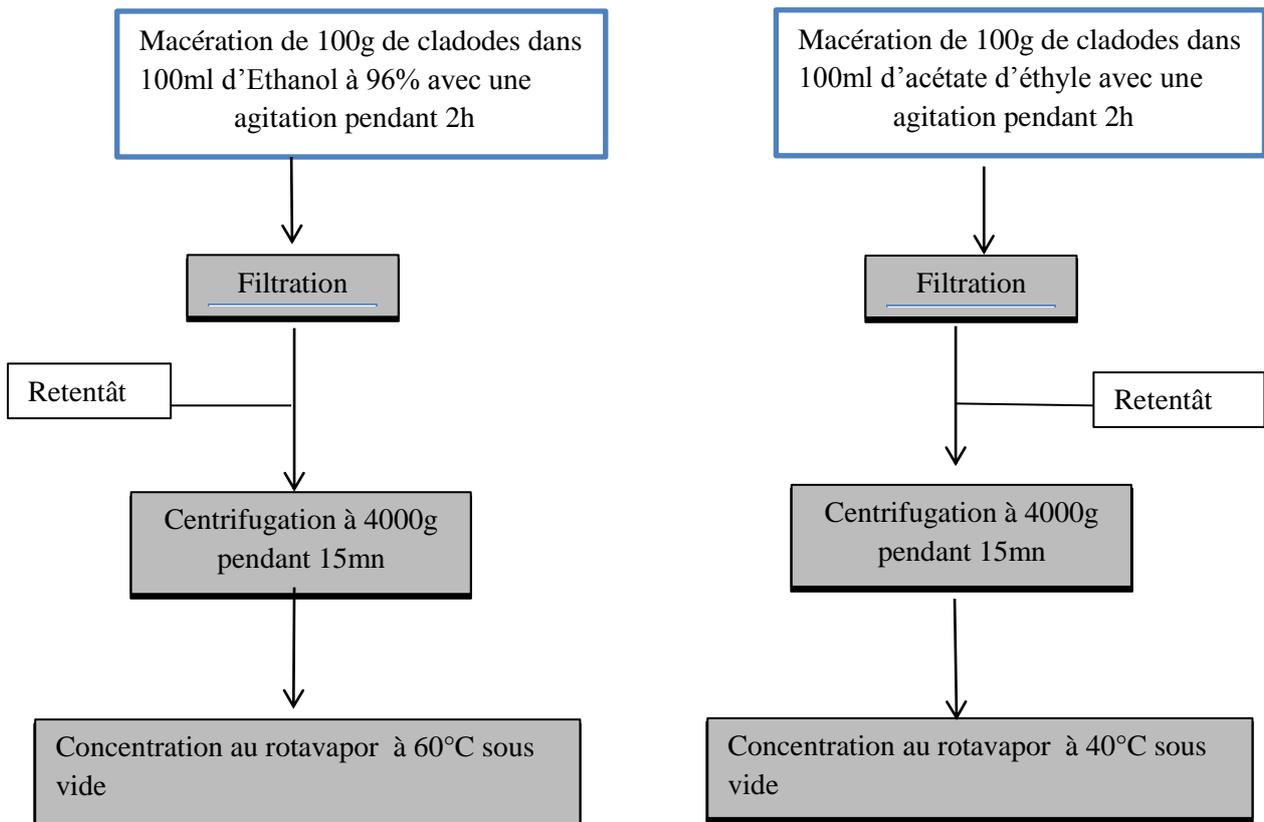


Figure 14. Protocole d’extraction de composés phénoliques à partir de cladodes du figuier de barbarie avec deux solvants organiques (acétate d’éthyle et éthanol)

1.2.2.4. Rendement d’extraction des composés phénoliques

Le rendement désigne la masse de l’extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage (%) par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l’extraction.

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

- R(%) : rendement exprimé en % ;
- M : masse en gramme de l’extrait sec résultant ;
- M₀ : masse en gramme du matériel végétal à traiter

1.2.3. Dosage des composés phénoliques totaux par colorimétrie

La teneur en composés phénoliques des différents extraits obtenus à partir des cladodes du figuier de barbarie, propolis et grignons d'olives a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon SINGLETON et ROSSI (1965). Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique du réactif de Folin par les groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Les solutions des différents échantillons à doser et la gamme étalon sont préparées de la même manière et dans les mêmes conditions. Deux essais ont été réalisés.

Un volume de 125 μ l de chaque extrait ou de sa dilution est ajouté à 500 μ l d'eau distillée puis additionné de 125 μ l du réactif de folin-ciocalteu. Après 6min, un volume de 1,25ml de la solution Na₂CO₃ à 7% est ajouté. Le volume total est ensuite agité puis ajusté à 3 ml avec de l'eau distillée. Les absorbances sont mesurées à 760nm après incubation pendant 1h à l'obscurité. La concentration des composés phénoliques totaux est déterminée à partir d'une courbe étalon en utilisant l'acide gallique comme standard avec une gamme allant de 0 à 200 μ g/ml.

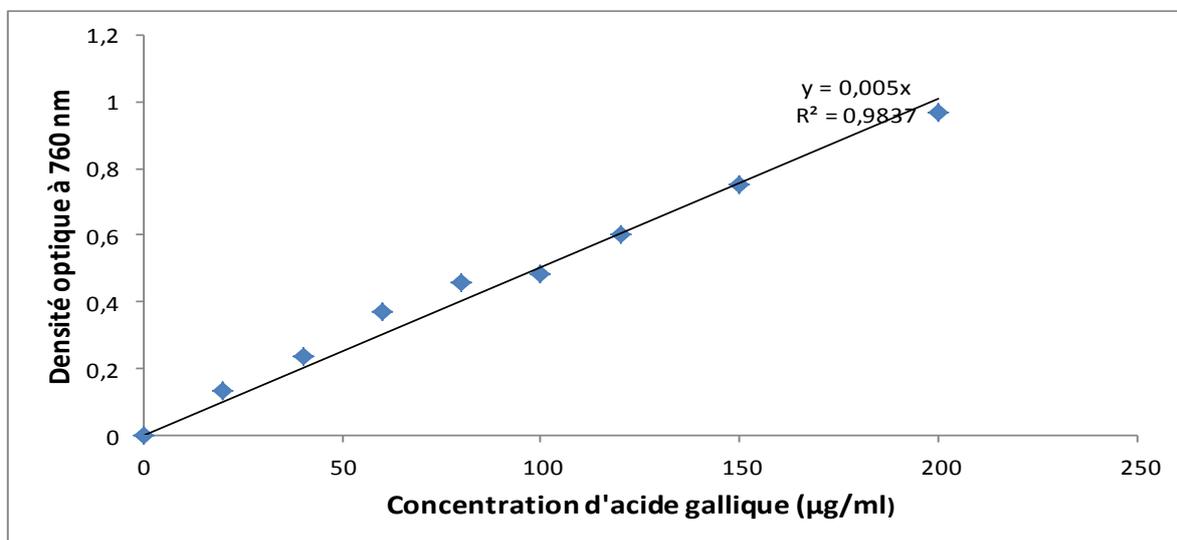


Figure 15. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

1.2.4. Essai de caractérisation des composés phénoliques par chromatographie sur couche mince

Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est basée sur le phénomène d'adsorption des solutés sur un adsorbant solide (silice ou alumine) fixé sur une plaque de verre ou de matière plastique ou d'aluminium. Les solutés sont soumis à une force d'entraînement par la phase mobile qui peut être un solvant ou un mélange de solvants. Chaque composant se déplace à sa propre vitesse qui dépend d'une part des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile.

Les taches sont facilement observable sur la plaque lorsque les échantillons sont naturellement colorés ; dans le cas contraire il est nécessaire de recourir à un procédé de révélation avec des radiations UV, fluorescence ou iode. Chaque soluté est caractérisé par un rapport frontal dans un éluant donné et pour une phase stationnaire donnée. Ce rapport est calculé par la formule suivante :

$$R_f = D_c / D_s$$

D_c : distance parcourue par le composé.

D_s : distance parcourue par le front du solvant.

Mode opératoire

Dans cette présente étude, un volume de chaque extrait est déposé sur une plaque d'aluminium sur laquelle est greffé le gel de silice de dimension (20×20) cm. Le mélange de solvant chloroforme /Acétate d'éthyle/Acide formique (50/40/10) (RIOV et GOTTLIEB, 2006) est utilisé comme phase mobile. Des composés phénoliques ont été utilisés comme standards à savoir l'acide caféique, l'acide gallique, l'acide p-coumarique et l'acide cinnamique. La révélation a été effectuée avec une solution de DPPH.

1.2.5. Test de l'activité anti-oxydante

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des composés phénoliques des échantillons étudiés, trois tests *in vitro* en duplicata ont été réalisés pour chaque échantillon (le test de DPPH, du pouvoir réducteur FRAP et le test de réduction du radical ABTS).

1.2.5.1. Test du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium (FRAP)

Le pouvoir réducteur des extraits phénoliques est basé sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ en Fe^{2+} en présence d'un antioxydant qui possède le pouvoir de céder des électrons. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés. Le protocole expérimental suivi est celui d'OUYAIZU (1986)

1.2.5.2. Méthode de Piégeage des radicaux libres par le test au 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité anti-radicalaire des composés phénoliques contenus dans les extraits préparés est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl). Ce dernier est stable au cours du temps et possède un électron non apparié sur un atome d'azote ce qui lui confère la capacité de produire des radicaux libre donnant à la solution une couleur violette foncée (COTELLE *et al.*, 1996 ; TROUILLAS *et al.*, 2003). En présence d'un antioxydant le radical DPPH est réduit formant ainsi un produit stable de couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 517 nm (MAATAOUI *et al.*, 2006).

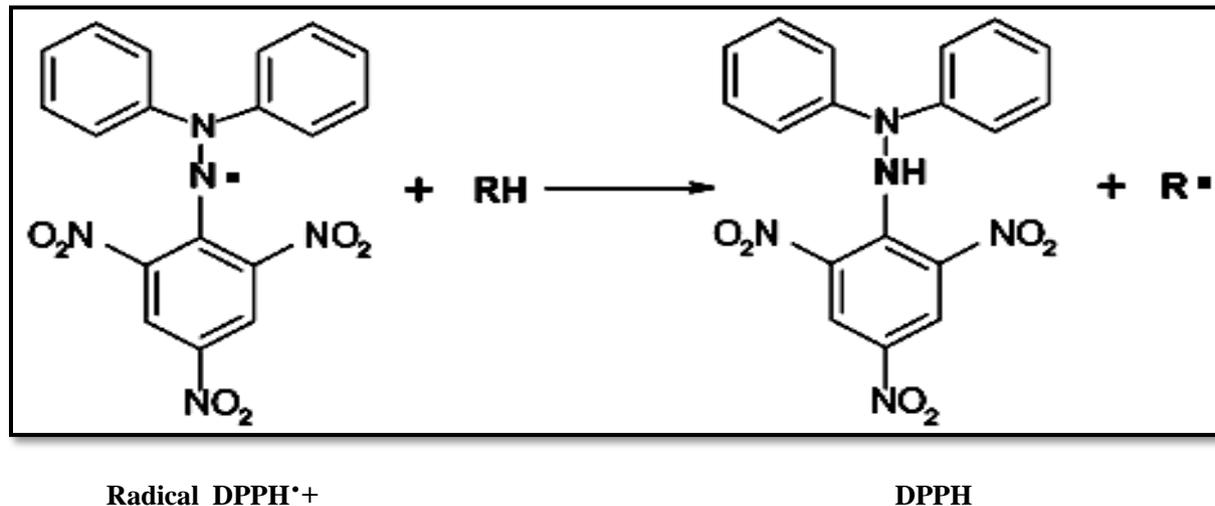


Figure 16. Structure du DPPH • et sa réduction par l'antioxydant RH (PAIXAO *et al.*, 2007).

Mode opératoire

Le protocole expérimental utilisé est celui de BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995). La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100ml de l'éthanol. Un volume des solutions d'extraits phénoliques ou standards sont ajoutés à 1ml de DPPH.

Après homogénéisation au vortex le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30min. les absorbances sont lues à 517nm. Les témoins positifs sont représentés par une solution d'acide gallique et une solution d'acide ascorbique comme antioxydants standards. Les concentrations des composés phénoliques utilisés varient selon les extraits.

Pour exprimer les résultats obtenus, le pourcentage d'inhibition est calculé, il correspond au pourcentage de DPPH• qui a été inhibé par les antioxydants présents dans les échantillons testés selon la formule ci-dessous proposée par YEN et DHU (1994).

$$\% \text{ DPPH}_{\text{inhibé}} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{blanc}} - \text{Absorbance}_{\text{échantillon}}}{\text{Absorbance}_{\text{blanc}}} \times 100$$

1.2.5.3. Piégeage des radicaux libres par le test au 2,2-azini-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS)

La formation du radical cationique ABTS^{•+} résulte de l'arrachement d'un électron de l'un des atomes d'azote de la molécule ABTS par un oxydant (le persulfate de potassium). En présence d'antioxydants donneurs de protons, ce radical l'ABTS^{•+} de coloration bleu-vert est réduit en ions ABTSH⁺ incolore. Le suivi de cette décoloration à 734 nm permet d'évaluer le potentiel anti-radicalaire de l'extrait (RE et al., 1999).

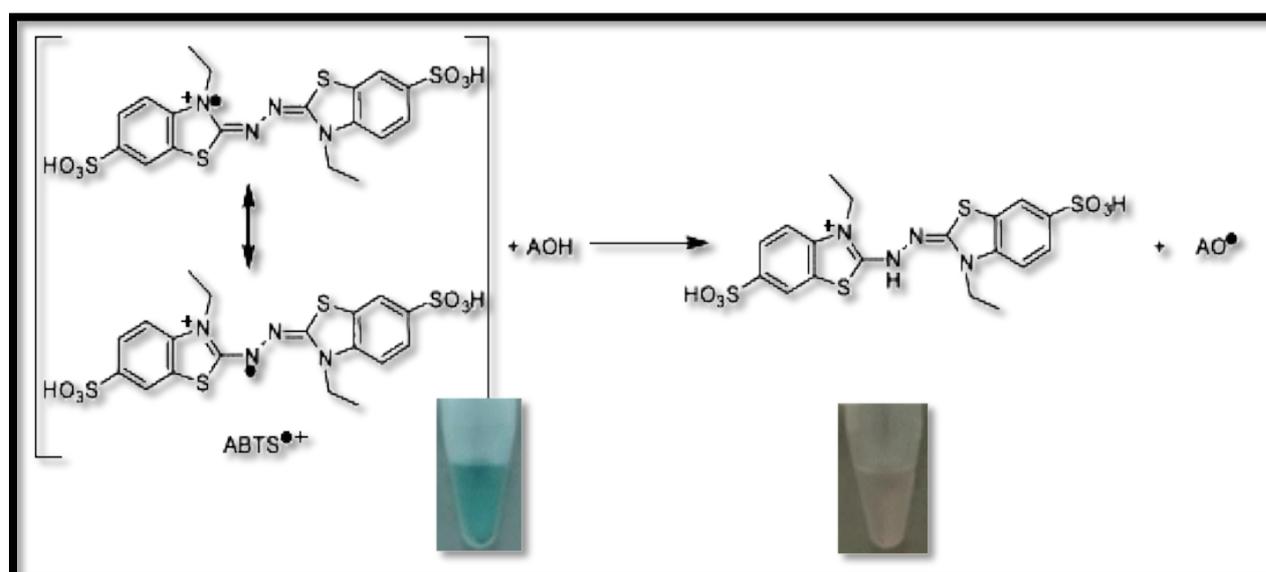


Figure 17. Processus de réduction du radical ABTS^{•+} en présence d'un antioxydant (RE et al., 1999)

Protocole

Le test ABTS a été réalisé selon la méthode de RE et *al.* (1999). Une solution ABTS à une concentration de 7 mM est préparée dans de l'eau déminéralisée qu'on mélange avec une solution de persulfate de potassium d'une concentration de 2,45 mM dans de l'eau déminéralisée. Laisser reposer à température ambiante dans l'obscurité de 12 à 16 heures. Un volume d'extrait est ajouté à 2ml de la solution ABTS. Le mélange est incubé pendant 6 min à l'obscurité puis les absorbances sont mesurées à 734 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard à des concentrations allant de 0 à 500 µg/ml. Pour déterminer les IC₅₀, différentes concentrations d'extrait ont été testées

Le pourcentage de réduction du radical ABTS^{•+} a été calculé par la loi ci-dessous.

$$\% \text{ ABTS}^{\cdot+} \text{ inhibé} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{blanc}} - \text{Absorbance}_{\text{échantillon}}}{\text{Absorbance}_{\text{blanc}}} \times 100$$

1.2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de propolis, de cladodes du figuier de barbarie et des grignons d'olives, la méthode de diffusion sur milieu gélosé a été réalisée en utilisant les disques stériles (SOMAIE et *al.*, 2013).

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet antimicrobien des différents extraits sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition en fonction du diamètre d'inhibition.

Les souches bactériennes utilisées ont été fournies par le laboratoire de recherche de la faculté. Elles comprennent des espèces Gram+ et Gram-.

Tableau IX. Les souches bactériennes testées

Souche	Etat frais	Gram
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	Coques	Gram+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	Bacille	Gram-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Coque	Gram-

- **Préparation des précultures**

Les souches bactériennes sontensemencées sur la gélose nutritive par la méthode de stries et incubées à 37°C, pour avoir des cultures jeunes après 18 heures.

- **Standardisation et préparation de l'inoculum**

A l'aide d'une anse a boucle de platine quelques colonies bien isolées et identiques sont prélevées à partir des précultures jeunes de chacune des souches bactériennes à tester. L'anse est ensuite déchargée des bactéries dans de l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture (colonies) s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop dense.

- **Réalisation de l'antibiogramme**

Pour ensemencher les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton un écouvillonnage est réalisé. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis essoré en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement se termine en faisant passer l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. Les disques imprégnés de 20 µl d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée et ce, à l'aide d'une pince stérile. La novobiocine est utilisée comme témoin positif et des disques imprégnés de 20µl de l'éthanol (évaporé) ont servi de témoins négatifs. Enfin, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

- **Lecture des antibiogrammes**

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibition au tour des disques. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits (PONCE et *al.*, 2003).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm.

1.2.7. Analyse statistique

Les résultats obtenus après l'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH, FRAP et ABTS) sont soumis à une analyse statistique. Ils subissent un test de régression linéaire qui repose sur l'évaluation de la force de la liaison existante entre deux variables quantitatives, mesurable par le coefficient de corrélation linéaire R. Plus R s'approche de 1 ou de -1 meilleure est la relation, la relation est d'autant faible lorsque R s'approche de 0.

Dans notre étude l'analyse statistique est réalisée sur ordinateur en utilisant le Microsoft Excel. Les deux variables quantitatives étudiées sont les IC₅₀ de test DPPH ou de l'ABTS et les PR_{0,5} de pouvoir réducteur.

II. Résultats et discussion

2.1. Evaluation de quelques caractéristiques physico-chimiques des coproduits utilisés

Les résultats des analyses physico-chimiques de base sur les trois coproduits étudiés concernent : la teneur en matière sèche, la teneur en eau, la teneur en cendre, le pH et la teneur en matière organique, sont donnés par le tableau ci-dessous.

Tableau X. Tableau récapitulatif des paramètres physico-chimiques des trois échantillons étudiés (propolis, cladodes du figuier de barbarie et grignons d'olives)

Paramètres physicochimiques	Propolis	Cladodes du figuier de barbarie	Grignons d'olives
Matière sèche totale (MST) (%)	99± 1,14	7,35± 4,74	65,4 ± 4,24
Humidité (%)	1,55 ± 0,78	92,65± 0,49	34,6 ± 0,42
Teneur en en cendre (TC)	5,1± 0,14	20± 0,7	1,85 ± 0,2
Teneur en matière (MO) organique (%)	94,78 ± 0,1	80± 0,7	97,63 ± 0,52
pH	5,95± 0,070	5,55± 0,07	5,25± 0,35

A partir du tableau X il est constaté que la propolis est très pauvre en eau avec un taux d'humidité de 1,55±0,78 % ce qui signifie que presque la totalité du poids de la propolis est constituée de la matière sèche lui conférant ainsi sa structure solide. Comparativement à la propolis d'Argentine étudiée par TOSI et *al.* (2006) qui ont trouvés des valeurs de teneurs en eau allant de 1,4% à 6,2%, les valeurs obtenues dans la présente étude sont en concordance avec celles-ci. La propolis étudiée présente des teneurs en cendre et en matière organique de l'ordre de 5,1±0,14 % et de 94,78±0,1 %, respectivement. Ces résultats sont en concordance avec la littérature (les cendres 5%, la matière organique 95%) (BANKOVA et *al.*, 1987). D'après les résultats obtenus la propolis étudiée présente un pH acide de 5,95±0,070 ce qui signifie qu'elle est de nature acide. Cette acidité serait probablement due à sa composition en acides aromatiques (acide benzoïque et ses dérivés) et en acides aliphatiques.

Les cladodes du figuier de barbarie renferment un taux d'humidité de $92,65 \pm 0,49$ %, une teneur en matière sèche de $7,35 \pm 4,74$ % et une teneur en cendre de $20 \pm 0,7$ %. Ces valeurs sont très proches de celles rapportées par HALMI (2015). Le taux d'humidité élevé dans les raquettes du figuier de barbarie lui confère une meilleure adaptation à la sécheresse ce qui permettrait de résoudre le problème de l'abreuvement de bétail dans les zones arides. Concernant le pH, la valeur enregistrée est de l'ordre de $5,55 \pm 0,07$. Cette valeur est légèrement supérieure à celles retrouvées par BOUTAKIOUT(2015) qui a constaté des valeurs comprises entre 4,49 et 4,77. Cette variation peut être liée à plusieurs facteurs à savoir la composition de sol, les facteurs climatiques et l'origine géographique.

Le taux d'humidité des grignons d'olives étudiés qui est de $34,6 \pm 0,42\%$ est proche de celui retrouvé par MOUZAOUÏ et *al* (2014) ($47,55 \pm 0,094\%$). Ce petit écart peut s'expliquer par la différence du système d'extraction de l'huile d'olive. Les valeurs obtenues pour les deux paramètres, taux de cendre ($1,85 \pm 0,2\%$) et la valeur du pH ($5,25 \pm 0,35$) sont en concordance avec la littérature où les valeurs du pH varient de 4,9 à 6,8 et les taux de cendre se situent dans la gamme allant de 1,7 à 4 (DERMECHE et *al.*, 2013).

2.2. Rendement d'extraction des polyphénols

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation de solvant. Il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initial de l'échantillon soumis à l'extraction.

Tableau XI. Rendement de l'extraction des polyphénols exprimé en pourcentage pour les différents extraits étudiés.

Extrait	Solvant	Rendement (%)
Propolis	Ethanol	20
	Acétate d'éthyle	52
Cladodes du figuier de barbarie	Ethanol	1,31
	Acétate d'éthyle	3,96
Grignons d'olives	Ethanol	0,48
	Acétate d'éthyle	2,7

Le tableau XI montre que l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis (EAP) a donné le meilleur rendement avec 52% suivi de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) avec 20%. Des rendements moins élevés ont été obtenus pour les extraits à l'acétate d'éthyle à partir des

cladodes (3,96 %) et des grignons (2,7%). Les valeurs les plus faibles ont été marquées par les extraits éthanoïques de cladodes du figuier de barbarie (1,31 %) et des grignons d'olives (0,48%).

2. 3. Dosage des composés phénoliques totaux des extraits

Le dosage des polyphénols totaux des différents extraits a été estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu. Pour cela, une droite d'étalonnage a été tracée avec l'acide gallique à des concentrations allant de 0 à 200 µg/ml. Des mesures de la densité optique pour chaque extrait ont été réalisées à 760 nm.

La quantité de polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la droite établie avec l'acide gallique « $y = 0,005x$ », où y correspond à la densité optique de l'extrait et x correspond à sa concentration. Elle est exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (ms), (mg EAG/g ms), issue de la matière brute de propolis, de cladodes du figuier de barbarie ou des grignons d'olives.

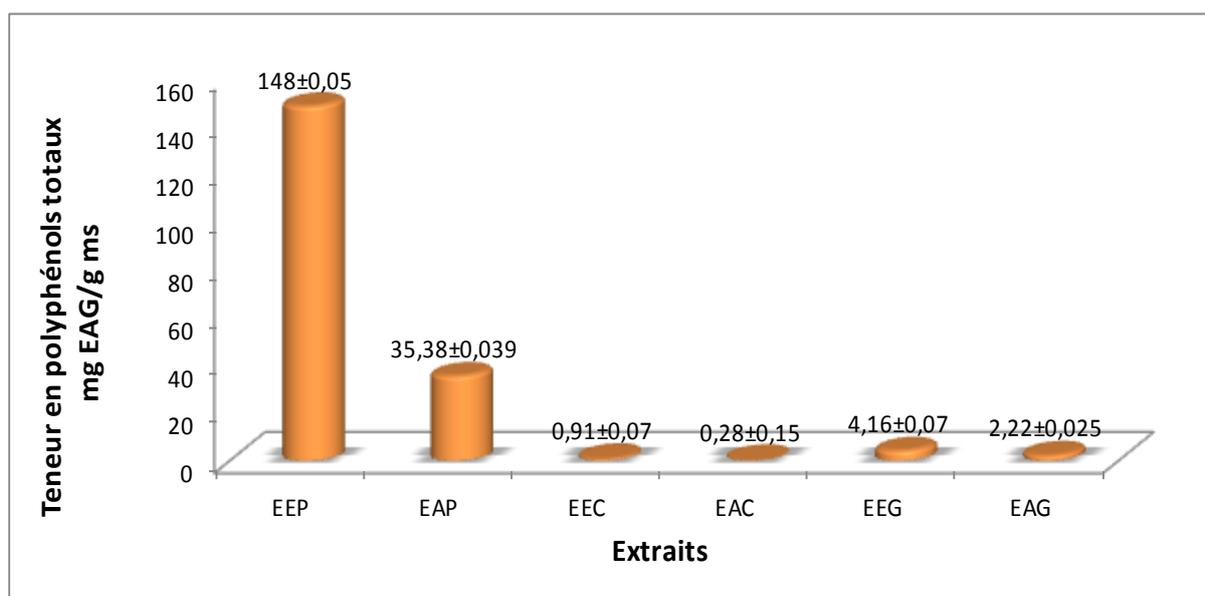


Figure18. Teneur en polyphénols des différents extraits. EEP : extrait éthanoïque de la propolis ; EAP: extrait d'acétate d'éthyle de la propolis ; EEC : extrait éthanoïque de cladodes du figuier de barbarie ; EAC : extrait d'acétate d'éthyle de cladodes du figuier de barbarie ; EEG : extrait éthanoïque des grignons d'olives ; EAG : extrait d'acétate d'éthyle des grignons d'olives.

D'après ces résultats, une variabilité remarquable dans la teneur en polyphénols totaux est notée pour les six extraits étudiés. La teneur la plus élevée est enregistrée pour l'EEP,

elle est de l'ordre de $148 \pm 0,05$ mg EAG/g ms, suivie de celle notée pour l'EAP avec une teneur de $35,38 \pm 0,039$ mg EAG/g ms, puis les extraits éthanoïques et d'acétate d'éthyle des grignons d'olives avec des teneurs égales à $4,16 \pm 0,07$ mg EAG/g ms et $2,22 \pm 0,025$ mg EAG/g ms, respectivement. Les teneurs les plus faibles ont été enregistrées pour les extraits éthanoïques et d'acétate d'éthyle de cladodes du figuier de barbarie avec des valeurs qui ne dépassent pas $0,91 \pm 0,07$ mg EAG/g ms et $0,28 \pm 0,15$, par ordre.

Parmi les études qui s'intéressent à la quantification des polyphénols, celle de CAN et *al.* (2015) qui ont étudié la propolis d'Azerbaïdjan possédant un contenu en polyphénols allant de 10 à 79 mg/g de propolis. En effet les résultats obtenus s'éloignent pas de cette dernière gamme et ce, avec des valeurs de 18,4 mg/g ms et de 29,6 mg/g ms pour les deux extraits de propolis, à l'éthanol et à l'acétate d'éthyle, respectivement.

À l'issue des dosages de polyphénols de l'EEG et de l'EAG, des valeurs élevées de 0,02 mg/g ms et 0,06 mg/g ms, respectivement, sont obtenues par rapport comparativement à celles rapportées par MOUZAOUÏ et *al.* (2014). Ces derniers ont mené des travaux sur les composés phénoliques des grignons d'olives issus de deux huileries différentes. Des valeurs de 0,00942 mg/g ms et 0,00764 mg/g ms ont été notées, respectivement, pour les grignons issus d'une huilerie moderne celui d'une huilerie traditionnelle. En effet, l'écart entre les résultats pourrait être lié à plusieurs facteurs tels que le degré de maturation des olives, l'état physiologique et l'âge de la plante (BOUDHRIOÛA et *al.*, 2009).

Concernant les cladodes du figuier de barbarie les concentrations en polyphénols sont l'ordre de 300 μ g/ml pour l'extrait éthanoïque ($0,91 \pm 0,07$ mg/g ms) et de 280 μ g/ml ($0,28 \pm 0,15$ mg/g ms) pour l'extrait d'acétate d'éthyle. Ces valeurs sont assez proches de celles rapportées par BOUTAKIOUT. (2015), qui sont comprises entre 456 à 524 μ g/ml. Cette différence pourrait s'expliquer par l'utilisation de système d'extraction différent étant donné que le solvant utilisé dans cette étude est le méthanol.

La variabilité des teneurs en polyphénols totaux pourrait être expliquées, d'une part, par la différence de polarité des solvants utilisés qui extraient des entités ayant des polarités différentes à partir d'un même coproduit. D'autre part, elle pourrait s'expliquer par l'utilisation de matières végétales différentes ce qui implique des conditions climatiques, des origines et des propriétés physico-chimiques différentes donc une composition chimique différente.

2.4. Analyse qualitative des composés phénoliques par chromatographie sur couche mince (CCM)

Après l'arrêt de la migration, la plaque de silice est soumise à un séchage suivi d'une révélation à l'aide d'une solution de DPPH, qui donne des taches jaunes correspondantes aux composés phénoliques (antioxydants). Les rapports frontaux des spots ont été calculés.

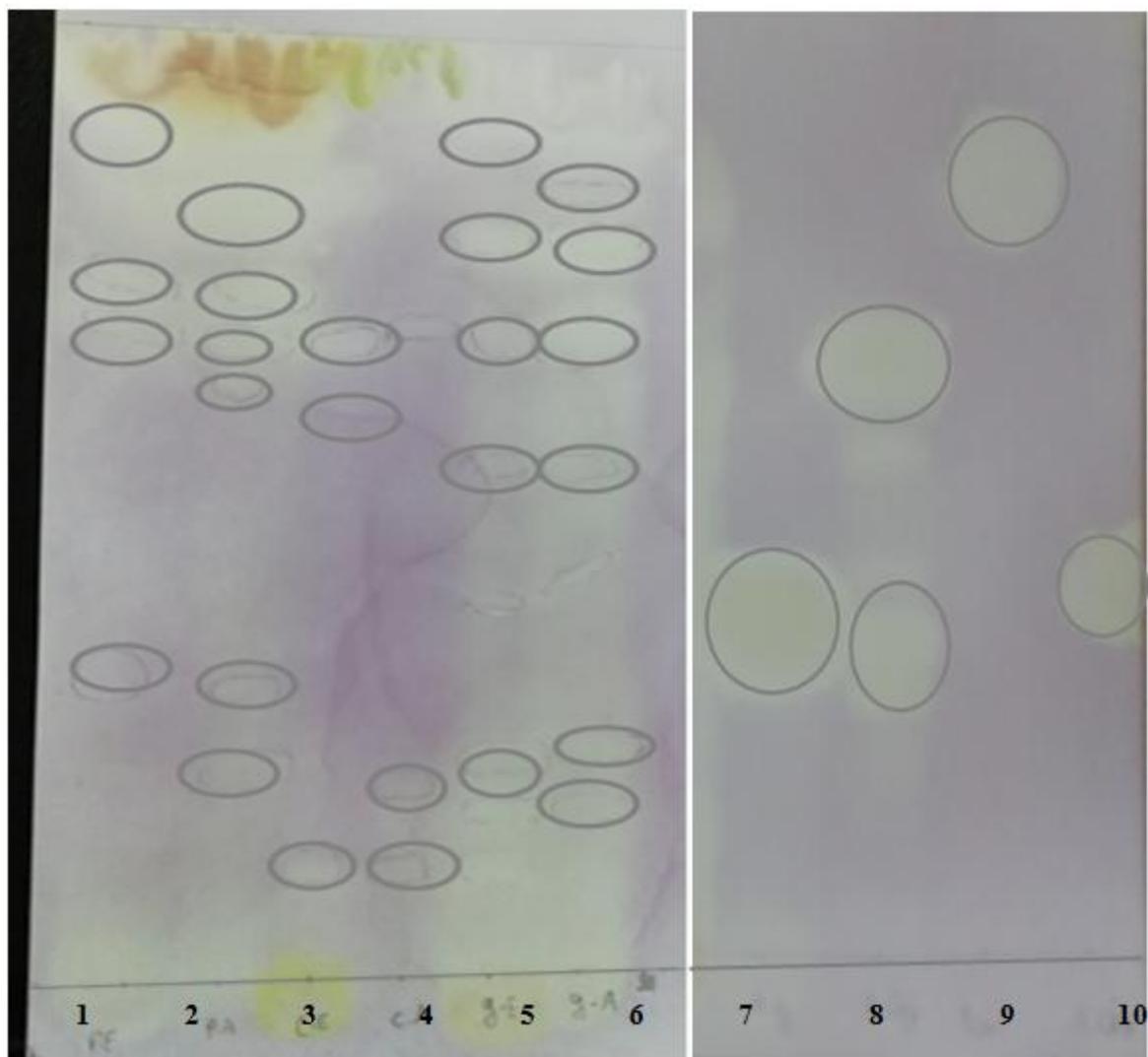


Figure 19. Profil chromatographique des composés phénoliques issus des échantillons extraits avec l'acétate d'éthyle et avec l'éthanol. 1. EEP 2. EAP 3. EEC 4. EAC 5. EEG 6. EAG 7. Acide gallique 8. Acide caféique+ acide gallique 9. Acide P-coumarique 10. Acide cinnamique..

Le profil chromatographique montre des différences et des ressemblances dans la composition et la richesse en composés phénoliques des extraits. Le profil de migration des deux extraits EAG et EAP montrent une richesse en composés phénoliques la plus élevée, par

rapport aux autres extraits. Celui-ci est constitué de six spots, suivi de cinq spots pour l' EEG et quatre spots pour l'EEP. Un nombre minimal de trois spots a été constaté pour l'EEC et uniquement deux spots pour l'EAC. Les profils de migration des extraits éthanoïques présentent des spots ayant migré plus loin que ceux représentant les entités retrouvées dans les autres extraits d'acétate d'éthyle. Ceci pourrait être dû à la présence des composés phénoliques moins polaires et moins volumineux.

Tableau XII. Rapports frontaux (R_f) des spots des extraits phénoliques et des standards dans le système : chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique (50/40/10)(v/v/v). EEP : extrait éthanoïque de la propolis ; **EAP:** extrait d'acétate d'éthyle de la propolis ; **EEC :** extrait éthanoïque de cladodes du figuier de barbarie ; **EAC :** extrait d'acétate d'éthyle de cladodes du figuier de barbarie ; **EEG :** extrait éthanoïque des grignons d'olives ; **EAG :** extrait d'acétate d'éthyle des grignons d'olives.

Extrait	Rapports frontaux (R_f)					
EEP	0,34	0,70	0,74	0,89		
EAP	0,22	0,32	0,60	0,70	0,74	0,80
EEC	0,12	0,59				
EAC	0,12	0,20	0,70			
EEG	0,23	0,55	0,68	0,79	0,89	
EAG	0,18	0,23	0,55	0,68	0,79	0,85
Acide gallique	0,34					
Acide caféique	0,6					
Acide p-coumarique	0,79					
Acide cinnamique	0,52					

À partir de ce tableau nous constatons des différences entre la contenance des différents extraits révélées par la variance en nombres et en valeurs de rapports frontaux correspondants à chacun des extraits. Cela pourrait être expliqué par l'utilisation de deux solvants de polarités différentes (éthanol et acétate d'éthyle), donc une affinité bien précise pour un composé phénolique donné. L'acétate d'éthyle est plus polaire que l'éthanol il a tendance à extraire les formes les plus polaires qui sont caractérisées par de petites distances de migration car elles se fixent sur la phase stationnaire; contrairement à l'éthanol qui a tendance à extraire des entités moins polaires qui migrent plus loin.

A partir des valeurs obtenues on peut distinguer des similitudes des rapports frontaux qui peuvent être expliquées par la présence des composés phénoliques identiques ou au contraire différents puisque un même niveau de migration peut être obtenu pour des spots correspondant à deux entités moléculaires différentes possédant la même polarité et la même masse.

Les taches ayant le R_f de 0,79 qui apparaissent dans le profil de migration de l'EAG et l'EEG pourraient s'agir de l'acide P-coumarique. Les taches ayant les R_f de 0,60 et 0,34 retrouvées dans le profil de migration de l'EAP et l'EEP, respectivement, pourraient s'agir, par ordre, de l'acide caféique et de l'acide gallique.

2.5. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques

2.5.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le test au radical 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Le test au radical DPPH repose sur la réduction de radical DPPH•, en présence d'un antioxydant, accompagnée par un changement de sa couleur qui passe du violet au jaune mesurable par spectrophotométrie à 517 nm (EBRAHIMZADEH et *al.*, 2010). L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH• est exprimée par la concentration inhibitrice à 50 % (IC₅₀), qui correspond à la concentration des polyphénols nécessaire pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH•. L'IC₅₀ est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire. Tous les IC₅₀ sont calculés à partir de l'équation de régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration des composés phénoliques présents dans les différents extraits testés (annexes 13, 14, 15, 16, 17, 18).

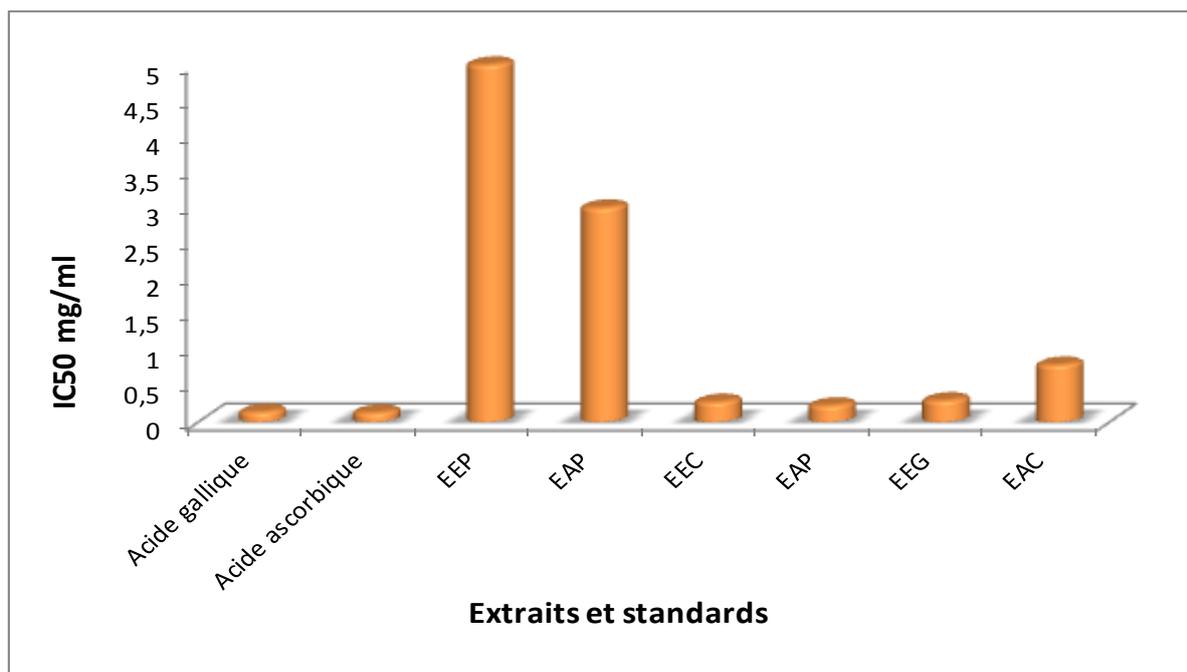


Figure 20. Les IC₅₀ des différents extraits phénoliques et standards donnés par le test au DPPH. **EEP** : extrait éthanoïque de la propolis ; **EAP** : extrait d'acétate d'éthyle de la propolis ; **EEC** : extrait éthanoïque de cladodes du figuier de barbarie ; **EAC** : extrait d'acétate d'éthyle de cladodes du figuier de barbarie ; **EEG** : extrait éthanoïque des grignons d'olives ; **EAG** : extrait d'acétate d'éthyle des grignons d'olives.

A partir des résultats représentés dans la figure 20 l'ensemble des extraits renferment des propriétés anti-radicalaires intéressantes qui se manifestent avec des valeurs faibles d'IC₅₀ dues à leurs capacités de céder des électrons pour réduire le radical DPPH•. En revanche, toutes les valeurs des IC₅₀ des différents extraits sont supérieures à celles marquées par l'acide gallique (0,14mg/ml) et l'acide ascorbique (0,13mg/ml). Ceci montre que tous les extraits ont une capacité réductrice inférieure à celle de l'acide gallique et de l'acide ascorbique.

L'EAC présente l'activité anti-radicalaire la plus élevée avec une IC₅₀ de 0,23mg/ml suivie de celle de l'EEC avec une valeur de 0,28mg/ml. L'EEG et l'EAG présentent également des activités anti-radicalaires considérables données par des valeurs respectives d'IC₅₀ de 0,3 mg/ml et 0,8mg/ml. Par contre, L'EEP et l'EAP présentent des activités anti-radicalaires les plus faibles, leurs IC₅₀ respectives sont de 5 et 3 mg/ml.

Selon les résultats enregistrés, les deux extraits de cladodes du figuier de barbarie ont montré des valeurs d'IC₅₀ proches de celle retrouvée par HALMI (2015) qui est de l'ordre de 0,309mg/ml.

Les deux extraits de propolis étudiés présentent un pouvoir antioxydant supérieur à celui de la propolis d'Azerbaïdjan étudié par CAN et *al.* (2015) lesquels ont trouvé des valeurs d'IC₅₀ comprises entre 15 et 198 mg/ml.

Les écarts entre les IC₅₀ des différents extraits sont probablement liés à la différence du profil phénolique qui varie en fonction du type d'extrait, de la méthode d'extraction des composés phénoliques et de la polarité des solvants utilisés. Des études montrent que le potentiel anti-radicalaire est positivement corrélé avec le taux de polyphénols et des flavonoïdes présents dans les extraits des plantes médicinales (MARIOD et *al.*, 2009 ; LOCATELLI et *al.*, 2010). Ceci suggère que l'effet antioxydant résulte d'un synergisme entre les polyphénols et d'autres composants.

2.5.2. Test du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium (FRAP)

Dans le but d'évaluer le pouvoir réducteur des extraits phénoliques étudiés, la méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) est appliquée sur l'ensemble des extraits. Cette méthode repose sur la réduction de Fe³⁺ contenu dans le complexe de ferrocyanure de potassium (K₃ Fe(CN)₆) en Fe²⁺ par un électron provenant de ces extraits. Cette réduction s'accompagne avec un changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au bleu-vert mesurable par spectrophotométrie à 700nm (PHILIPS et *al.*, 2010). Pour comparer entre les activités des différents extraits, la procédure est de déterminer graphiquement le PR_{0,5} qui est définie comme la concentration d'un composé en µg/ml qui donne une densité optique de 0,5 à 700 nm qui est inversement proportionnelle au pouvoir réducteur (ARDESTANI et YAZDANPARAST, 2007).

Tableau XIII. Concentration des extraits donnant après réduction du ferrocyanure de potassium une absorbance de 0,5 (PR_{0,5}). EEP : extrait éthanoïque de la propolis ; **EAP**: extrait d'acétate d'éthyle de la propolis ; **EEC** : extrait éthanoïque de cladodes du figuier de barbarie ; **EAC** : extrait d'acétate d'éthyle de cladodes du figuier de barbarie ; **EEG** : extrait éthanoïque des grignons d'olives ; **EAG** : extrait d'acétate d'éthyle des grignons d'olives.

Extraits et standard	PR _{0,5} (µg/ml)
Acide ascorbique	58,13
EEP	12,89
EAP	35,93
EEC	5,3
EAC	18,7
EEG	6,5
EAG	58

De part le tableau XIII et les Annexes 8, 9 et 10 tous les extraits possèdent un potentiel réducteur plus important même supérieur à celui de standards déterminé par des valeurs de PR_{0,5} inférieures à celle de l'acide ascorbique (58,13 µg/ml). Il apparait clairement que les extraits éthanoïques des différents coproduits étudiés présentent des pouvoirs réducteurs plus élevés que ceux de l'acétate d'éthyle. Ceci pourrait s'expliquer par la variabilité des composés phénoliques présents dans chaque extrait.

Les résultats obtenus pour les cladodes du figuier de barbarie sont nettement inférieurs à ceux rapportés par HALMI (2015), les valeurs rapportées par l'auteur montrent des pouvoirs réducteurs très faibles notés par des PR_{0,5} supérieurs à 1mg/ml.

Les résultats obtenus avec l'EEP (12,89 µg/ml) ont été comparés avec ceux de LEANDRO et al. (2008) qui ont mené des travaux sur la propolis de Portugal. Des pouvoirs réducteurs très proches ont été obtenus avec les extraits éthanoïques de la propolis de Bornes caractérisé par un PR_{0,5} de 0,009 mg/ml. En revanche, un écart très considérable est enregistré par rapport à l'extrait éthanoïque de la propolis de Fundao présentant un faible pouvoir antioxydant estimé par une valeur de PR_{0,5} de 0,55mg/ml. Cet écart peut être expliqué par la différence de profile phénolique qui résulte de la diversité de la flore botanique et la race d'abeille responsable de la production de la propolis.

2.5.3. Evaluation de l'activité antioxydante par le test au radical 2,2-azini-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS)

Cette méthode repose sur la réduction du radical cationique $ABTS^{•+}$ par un atome d'hydrogène ou un électron provenant d'un antioxydant, entraînant une décoloration du milieu réactionnel, estimée par spectrophotométrie à 734nm. La valeur IC_{50} désigne la concentration en polyphénols nécessaire pour inhiber 50% du radical $ABTS^{•+}$. Elle est calculée à partir de l'équation de régression linéaire des pourcentages d'inhibitions en fonction de la concentration des composés phénoliques testés.

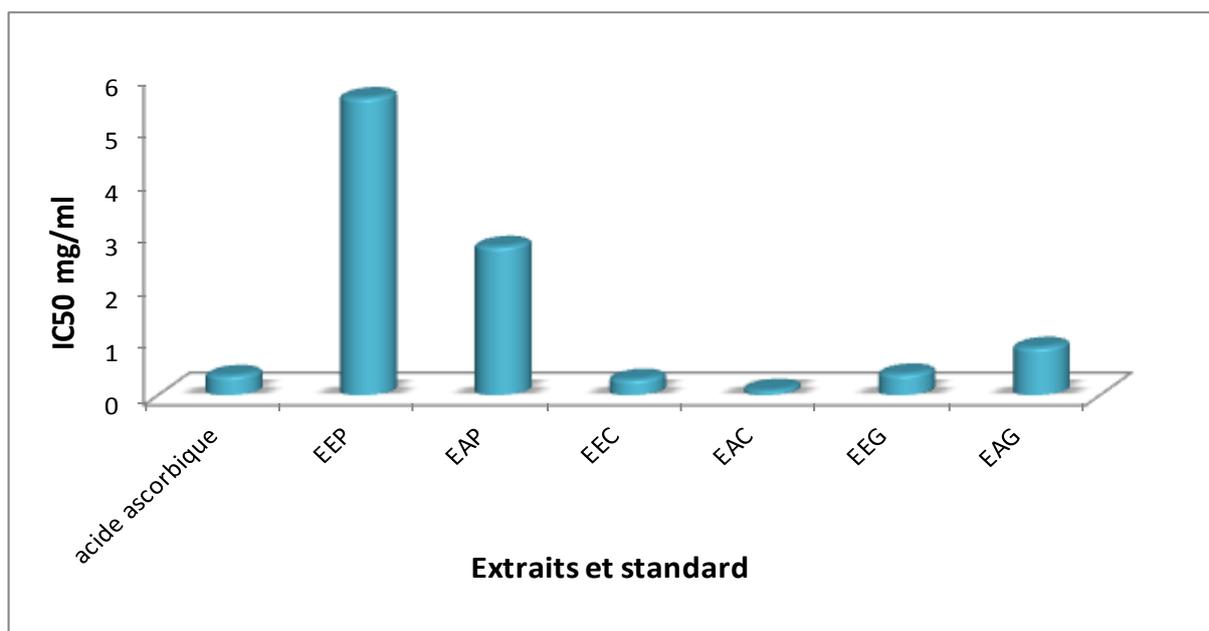


Figure 21. Les IC_{50} des différents extraits phénoliques et standard donnés par le test à l'ABTS. **EEP** : extrait éthanoïque de la propolis ; **EAP** : extrait d'acétate d'éthyle de la propolis ; **EEC** : extrait éthanoïque de cladodes du figuier de barbarie ; **EAC** : extrait d'acétate d'éthyle de cladodes du figuier de barbarie ; **EEG** : extrait éthanoïque des grignons d'olives ; **EAG** : extrait d'acétate d'éthyle des grignons d'olives.

D'après les résultats obtenus, les différents extraits ont donné une activité anti-radicalaire très importante avec des valeurs IC_{50} relativement faibles variant de 0,1 à 5,6 mg/ml. Le test révèle que tous les extraits possèdent une activité anti-radicalaire inférieure à celle de l'acide ascorbique sauf l'EAC ($IC_{50} = 0,1$ mg/ml) ce qui confirme la richesse de cet extrait en polyphénols et en flavonoïdes.

L'EEP a montré une activité antioxydante la plus faible caractérisée par une IC_{50} de 5,6 mg/ml, alors que l'activité la plus élevée est marquée par l'EAC avec un IC_{50} de 0,1 mg/ml.

Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux retrouvés par EL GUENDOZ et *al.* (2017) qui ont mené des travaux sur l'activité antioxydante de la propolis Marocaine. En effet, ils ont obtenu une activité très importante pour l'EEP exprimé par un IC₅₀ de 0,016 mg/ml et même supérieure à celle de la propolis trouvée dans cette étude. Cette activité élevée de la propolis Marocaine résulte de sa richesse en composés flavonoïques responsable de l'activité antioxydante (132,039 mg naringing/g de propolis).

Les deux extraits de cladodes du figuier de barbarie présentent des activités anti-radicalaires moins importantes que celle rapportée par BOUTAKIOUT (2015), estimée par une valeur d'IC₅₀ de 0,048mg/ml. Cette différence de l'activité anti-radicalaire pourrait être attribuée au fait que nous avons utilisé des solvants de polarités différentes de celle de solvant utilisé par l'auteur (méthanol).

Les deux extraits des grignons d'olives montrent une activité anti-radicalaire assez faible par rapport à celle enregistrée ALIAKABARIAN et *al.* (2012) ayant effectué une étude sur l'activité antioxydante de l'extrait méthanoïque des grignons d'olives. En effet ils ont montré une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 0.069 µg/ml.

2.6. Évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur milieu solide

Ce test vise à mettre en évidence la présence ou l'absence d'une activité antimicrobienne des différents extraits étudiés vis-à-vis des trois souches bactériennes utilisées à savoir, *Staphylococcus aureus* 43300, *Klebsiella pneumoniae* 4352, *Escherechia coli* 25922. L'action antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo autour du disque de papier imprégné de l'extrait. Le degré de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne aux composés contenus dans les différents extraits est estimé par le diamètre de la zone d'inhibition. Les diamètres des zones d'inhibitions exercées par les extraits phénoliques étudiés sont représentés dans la figure 22.

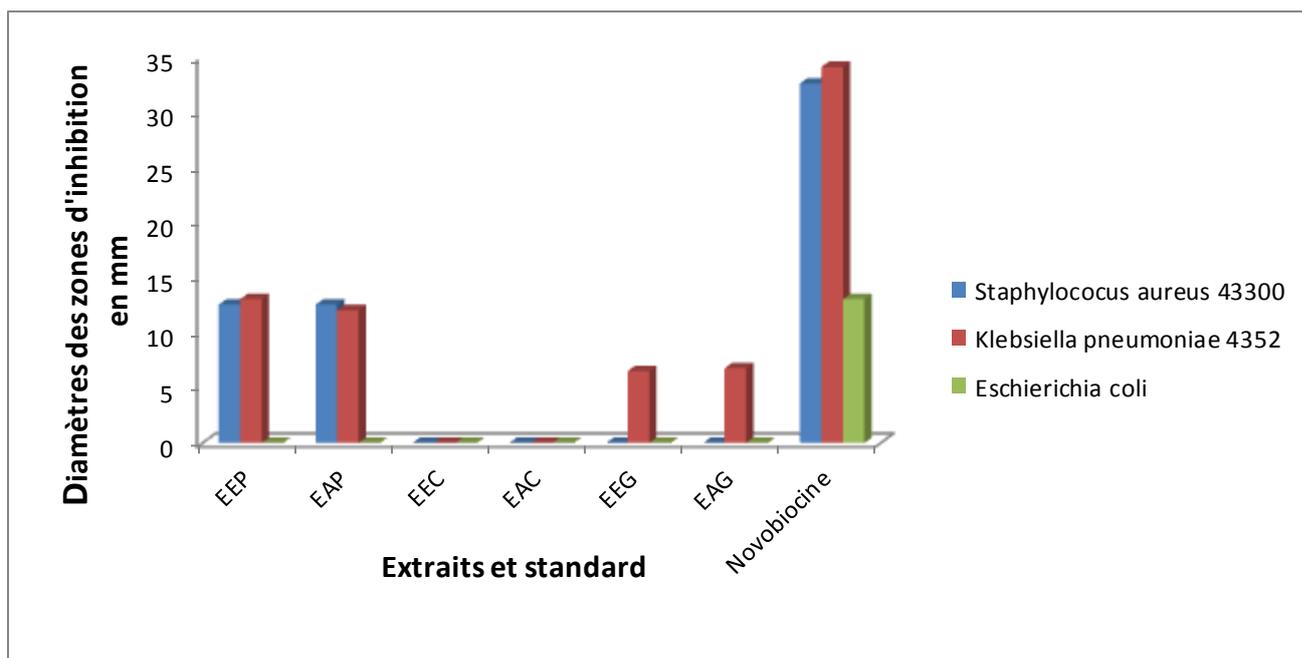


Figure 22. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) résultants de l'action des différents extraits phénoliques sur *Staphylococcus aureus* 43300, *Klebsiella pneumoniae* 4352 et *Escherichia coli* 25922. EEP : extrait éthanoïque de la propolis ; EAP: extrait d'acétate d'éthyle de la propolis ; EEC : extrait éthanoïque de cladodes du figuier de barbarie ; EAC : extrait d'acétate d'éthyle de cladodes du figuier de barbarie ; EEG : extrait éthanoïque des grignons d'olives ; EAG : extrait d'acétate d'éthyle des grignons d'olives.

A partir des résultats représentés dans la figure 22 il est constaté que les composés phénoliques contenus dans la propolis possèdent une activité importante contre la souche Gram⁺ *Staphylococcus aureus* et la souche Gram⁻ *Klebsiella pneumoniae*. L'EEP a enregistré une inhibition remarquable contre *Klebsiella pneumoniae* estimée par une zone d'inhibition de 13mm et contre *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 12,5mm. L'EAP montre une zone d'inhibition maximale contre *Staphylococcus aureus* avec une valeur de 12,5 mm et une zone d'inhibition minimale contre *Klebsiella pneumoniae* considérée de 12 mm. Tandis que, aucune zone d'inhibition n'est marquée contre *Escherichia coli* pour les deux extraits

Les résultats obtenus avec l'EEP ont été comparés avec ceux trouvés par NEDJI et LOUCIF-AYAD (2014). Ces auteurs ont testés l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanoïque de la propolis Algérienne provenant de quatre localités différentes. Les résultats auxquels on est parvenus coïncides avec ceux obtenus par ces auteurs avec la propolis de

Seraidi contre la souche *Staphylococcus aureus* (12,8mm). En revanche, ils ont enregistré la présence d'une activité, contrairement à nos résultats, pour le même extrait sur la souche *Escherichia coli*. Cela peut être attribué à la capacité de l'agent antimicrobienne à diffuser uniformément dans l'agar. Les résultats obtenus avec l'EEP contre *Klebsiella pneumoniae* ont été comparés avec ceux de GRAIKOU *et al.* (2015) qui ont testé l'activité antimicrobienne de la propolis de plusieurs régions méditerranéennes. Des valeurs identiques ($12 \pm 1,89$ mm (Meligalas), $12 \pm 0,088$ mm (Limassol), $12 \pm 1,72$ mm (Trogir)) contre la souche *Klebsiella pneumoniae* ont été enregistrées avec certaines régions et des valeurs proches ou même différentes avec d'autres régions ($18 \pm 0,38$ mm (Mani), $16 \pm 0,48$ mm (Sisses), $15 \pm 1,12$ mm (Kos)). Cela pourrait être dû à la différence de la composition phénolique liée à la différence entre les origines géographiques de la propolis.

Les résultats indiquent que tous les extraits des cladodes d'*Opuntia ficus indica* se sont avérés inactifs contre les trois souches. Les résultats trouvés dans cette étude sont en concordance avec les résultats d'ABOU RAJI EL FEGHALI *et al.* (2018) lesquels ont testé l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanoïque d'*Opuntia ficus indica* du Liban sur les mêmes souches bactériennes. Cela peut s'expliquer par la variabilité des propriétés physico-chimiques des composés phénoliques contenus dans les raquettes d'*Opuntia ficus indica* et leur instabilité et sensibilité à l'action oxydante de l'air et de la lumière (PHAM HUY *et al.*, 2008).

Les trois souches testées présentent un potentiel de résistance vis-à-vis des deux extraits des grignons. Cependant une petite zone d'inhibition est enregistrée contre *Klebsiella pneumoniae* de 6,5 mm pour l'EEG et 6,75 mm pour l'EAG. Cette absence d'effet antimicrobien est soit due à la résistance des souches étudiées aux agents antimicrobiens, soit à l'insuffisance de la diffusion des extraits dans la gélose, du volume ou la concentration utilisés.

2.7. Analyse statistiques

- **Corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire DPPH/ABTS et le pouvoir réducteur (FRAP)**

Dans la présente étude trois tests ont été employés pour évaluer l'activité antioxydante des différents extraits étudiés à savoir le test DPPH, ABTS et FRAP. Ces trois tests sont basés sur les propriétés redox des antioxydants présents dans les différents extraits étudiés. Pour

déterminer la relation existante entre ces trois tests nous avons procédé au test de régression linéaire qui repose sur l'évaluation de la force de la liaison existante entre deux variables quantitatives, mesurables par le coefficient de corrélation linéaire R.

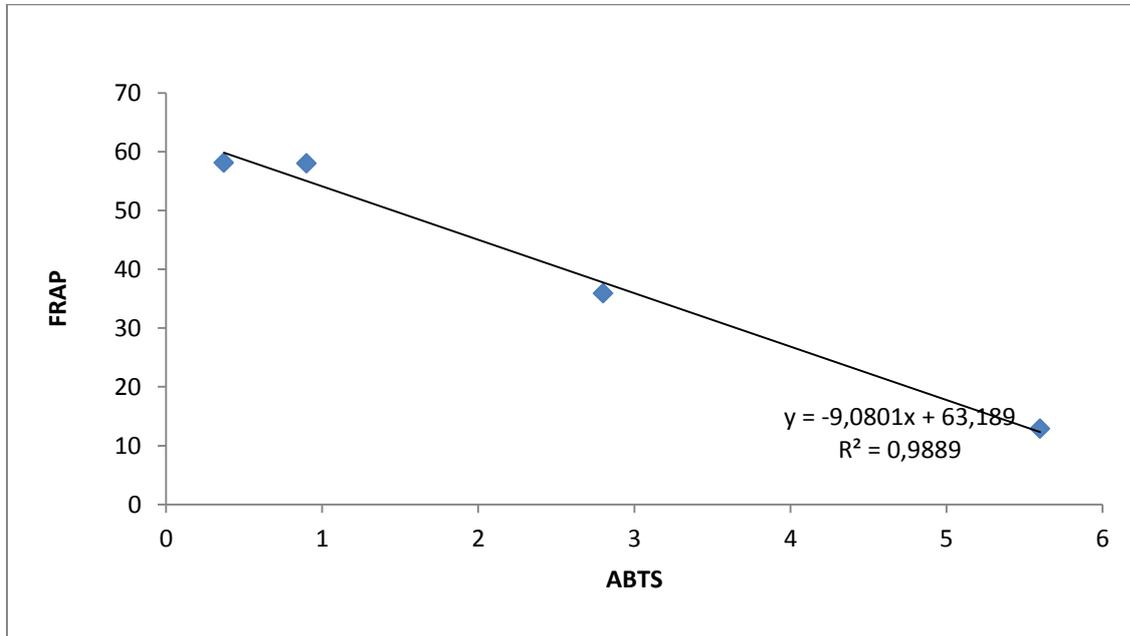


Figure 23. Corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire ABTS et le pouvoir réducteur

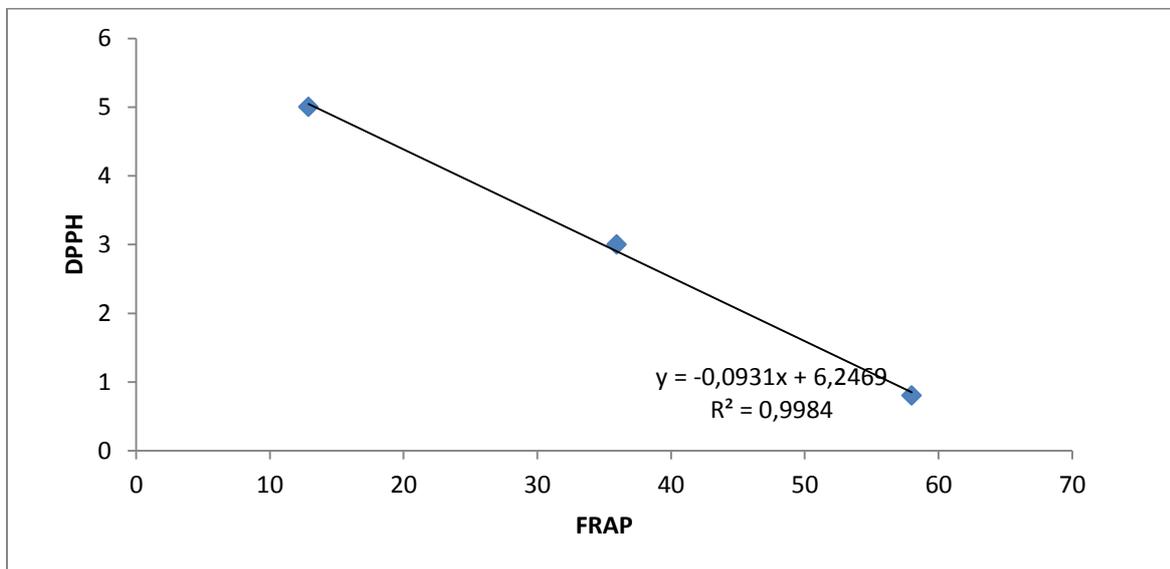


Figure 24. Corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire DPPH et le pouvoir réducteur

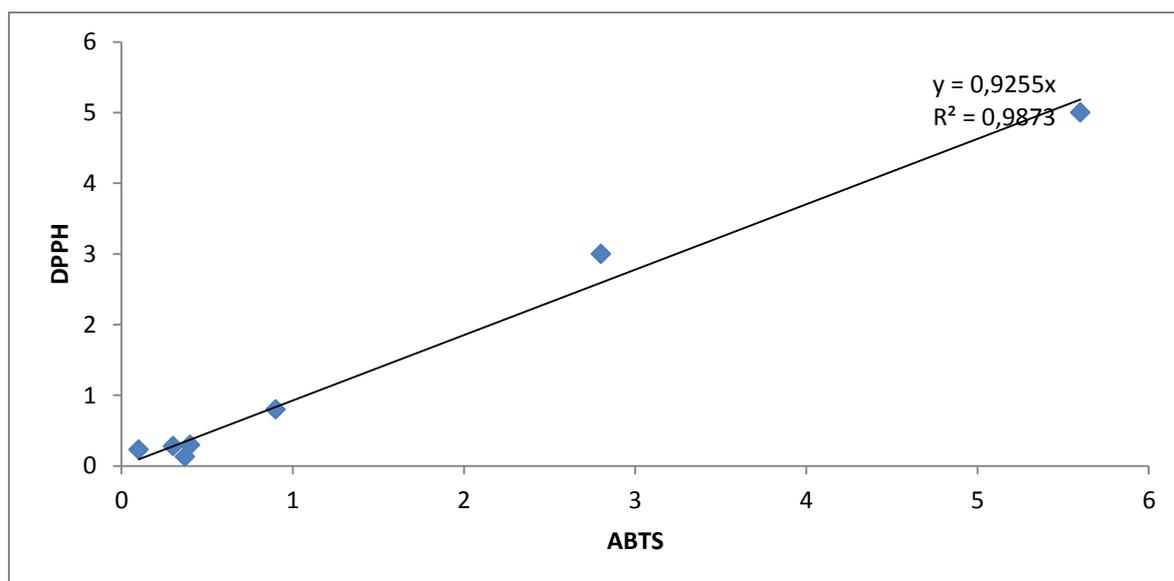


Figure 25. Corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire ABTS et DPPH

Les coefficients de corrélation obtenus reflètent l'existence d'une très bonne corrélation entre l'activité anti-radicalaire estimée par le test de DPPH et l'activité anti-radicalaire estimée par le test d'ABTS exprimée par un coefficient de corrélation de $R=0,98$ (figure. 25). Cela peut être lié au fait que les deux tests font intervenir les mêmes mécanismes d'action qui consistent à céder des électrons ou des hydrogènes pour éliminer les radicaux libres. Tandis qu'une corrélation négative existe entre le test de DPPH est FRAP et entre le test FRAP et ABTS estimée par des coefficients de corrélation respectifs de $R=-0,98$ (figure.24) et $R=0,99$ (figure. 23). Cela semble être dû d'une part au fait que le test de DPPH et de l'ABTS font intervenir un mécanisme d'action différent de celui de FRAP qui est basé sur le transfert d'électron uniquement. D'autre part, cela pourrait s'expliquer par la nature des composés responsables de l'activité antioxydante.

Les résultats obtenus pour le test de corrélation linéaire entre le test d'ABTS /DPPH($R=0,98$) sont en concordance avec ceux rapportés par ANDRADE et *al.*(2017). Ces auteurs ont évalués les activités biologiques de la propolis Brésilienne. Ils ont notés l'existence d'une corrélation positive entre le test de DPPH et celui de l'ABTS estimée par un coefficient de corrélation de $R= 0.97$. En revanche une bonne corrélation est enregistrée entre les tests ABTS /FRAP et FRAP/DPPH estimée par des coefficients de corrélation respectifs de $R= 0.85$ et $R = 0.97$ contrairement aux résultats obtenus dans la présente étude.

Conclusion

Conclusion

Le présent travail est une contribution à l'étude de quelques propriétés biologiques des extraits phénoliques issus de trois coproduits végétaux : la propolis, les cladodes du figuier de barbarie et les grignons d'olives. Les analyses physico-chimiques montre que la propolis contient la teneur en matière sèche totale la plus élevée ($99\pm 14,14\%$). la teneur en eau et en cendre les plus importantes sont représentées par les cladodes de figuier de barbarie. Tandis que des pH acides sont obtenus pour les trois coproduits, ainsi que des teneurs en matières organiques élevées. Les meilleurs rendements d'extraction ont été marqués par les extraits d'acétate d'éthyle des trois coproduits étudiés avec des valeurs comprises entre 2,7 et 52%. La teneur en composés phénoliques la plus élevée est notée pour les deux extraits de la propolis (EEP ayant $148\pm 0,05$ mg EAG/g ms et EAP ayant $35,38\pm 0,039$ mg EAG/g ms).

Le test au radical DPPH montre que les deux extraits de cladodes du figuier de barbarie possèdent une meilleure capacité réductrice (EEC ayant $IC_{50}=0,28$ mg/ml, EAC ayant $IC_{50}=0,23$ mg/ml) par rapport aux deux extraits de grignons d'olives (EEG d'un $IC_{50}=0,3$ mg/ml et EAG d'un $IC_{50}=0,8$ mg/ml). Tandis que, la plus faible activité antiradicalaire est enregistrée pour la propolis.

Le test au ABTS montre des résultats très proches de ceux de DPPH. Cependant, les deux extraits de cladodes du figuier de barbarie ont montré une meilleure capacité réductrice (EEC avec $IC_{50}=0,3$ mg/ml, EAC avec $IC_{50}=0,1$ mg/ml) par rapport à celle de l'acide ascorbique ($IC_{50}=0,37$ mg/ml). Les autres extraits possèdent des activités moins importantes estimées par des IC_{50} allant de 0,4 à 5,6 mg/ml.

Tous les extraits sont doués d'un pouvoir réducteur supérieur à celui de l'acide ascorbique ($PR_{0,5}= 58,13$ µg/ml). Les extraits éthanoïques présentent les meilleures pouvoirs réducteurs (EEC avec $PR_{0,5}=5,3$ µg/ml, EEP avec $PR_{0,5}=12,89$ µg/ml et EEG avec $PR_{0,5}=6,5$ µg/ml) par rapport aux extraits d'acétate d'éthyle (EAC de $PR_{0,5}=18,7$ µg/ml, EAP de $PR_{0,5}=35,93$ µg/ml et EAG de $PR_{0,5}=58$ µg/ml).

L'analyse statistique par le test de régression linéaire reflète une très bonne corrélation entre les trois tests ABTS, DPPH et FRAP (ABTS/DPPH avec $R=0,98$, ABTS/FRAP avec $R=-0,98$ et DPPH/FRAP avec $R=-0,99$).

L'analyse qualitative des extraits phénoliques par chromatographie sur couche mince révèle l'existence de similitudes et des différences en composés phénoliques contenus dans

les différents extraits. La technique a permis également d'identifier l'existence de l'acide p-coumarique dans les deux extraits de grignons d'olives et la présence de l'acide caféique et l'acide gallique dans les deux extraits de propolis.

Les résultats obtenus montrent une sensibilité des deux souches *Klebsiella pneumoniae* (diamètre d'inhibition $13 \pm 1,41$ mm par l'EEP et $12 \pm 2,1$ par l'EAP) et *Staphylococcus aureus* (diamètre d'inhibition de $12,5 \pm 2,8$ mm pour l'EEP et $12,5 \pm 2,1$ mm pour l'EAP) aux composés phénoliques contenus dans les deux extraits de propolis.

En perspectives, des tests in vivo seraient intéressants à réaliser et l'exploration d'autres activités biologiques serait aussi avantageuse. Il est aussi essentiel de déterminer les composés phénoliques contenus dans les différents coproduits par des méthodes plus performantes comme la chromatographie liquide couplée à spectroscopie de masse (LC-MS).

Annexes

Annexe 1. Préparation des solutions

- **Tampon phosphate (pH=6,6)**

C'est une solution de 1/15 M de phosphate dissodique (Na_2HPO_4) et 1/15 M de phosphate dipotassium (K_2HPO_4).

- dissoudre 1,9 g de Na_2HPO_4 dans 200 ml d'eau distillé
- dissoudre 1,8g de K_2HPO_4 dans 200ml d'eau distillé

Ensuite, un volume de 14,9 ml de la solution de Na_2HPO_4 est mélangé avec un volume de 25,1 ml de la solution de K_2HPO_4 .

- **Na_2CO_3 à 7%**

Dissoudre 7g dans un volume de 100 ml d'eau distillée

- **$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%**

Dissoudre 1g dans un volume de 100 ml d'eau distillée

- **FeCl_3 à 0,1%**

Dissoudre 0,1g dans 100 ml d'eau distillée

- **Solution mère d'acide gallique de concentration 0 à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$**

Une quantité de 2mg d'acide gallique (pesé sur une balance de précision) est dissoute dans 10 ml d'eau distillée.

- **Réalisation des dilutions à partir de la solution mère**

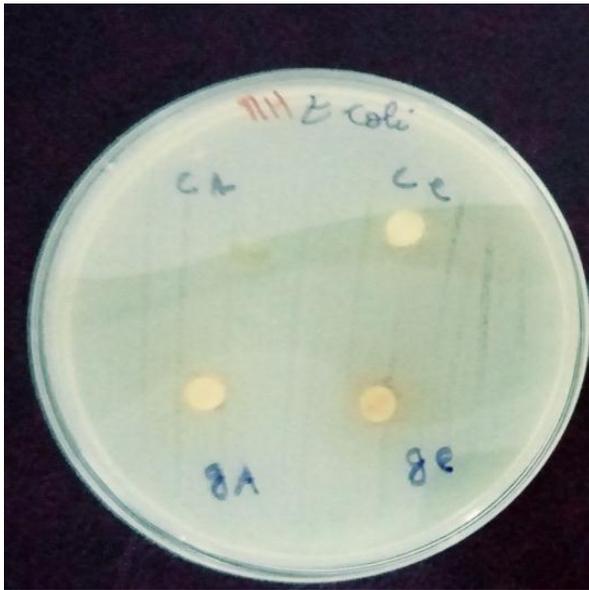
Les dilutions à partir de la solution mère sont obtenues en appliquant la loi $C_1.V_1 = C_2.V_2$

C_1 : Concentration de la solution mère (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

V_1 : Volume inconnu de la solution mère qu'il faut prélever et ajuster avec l'eau distillée à un volume bien définie (1000 μl par exemple)

C_2 : Concentration de la solution diluée que l'on veut préparer

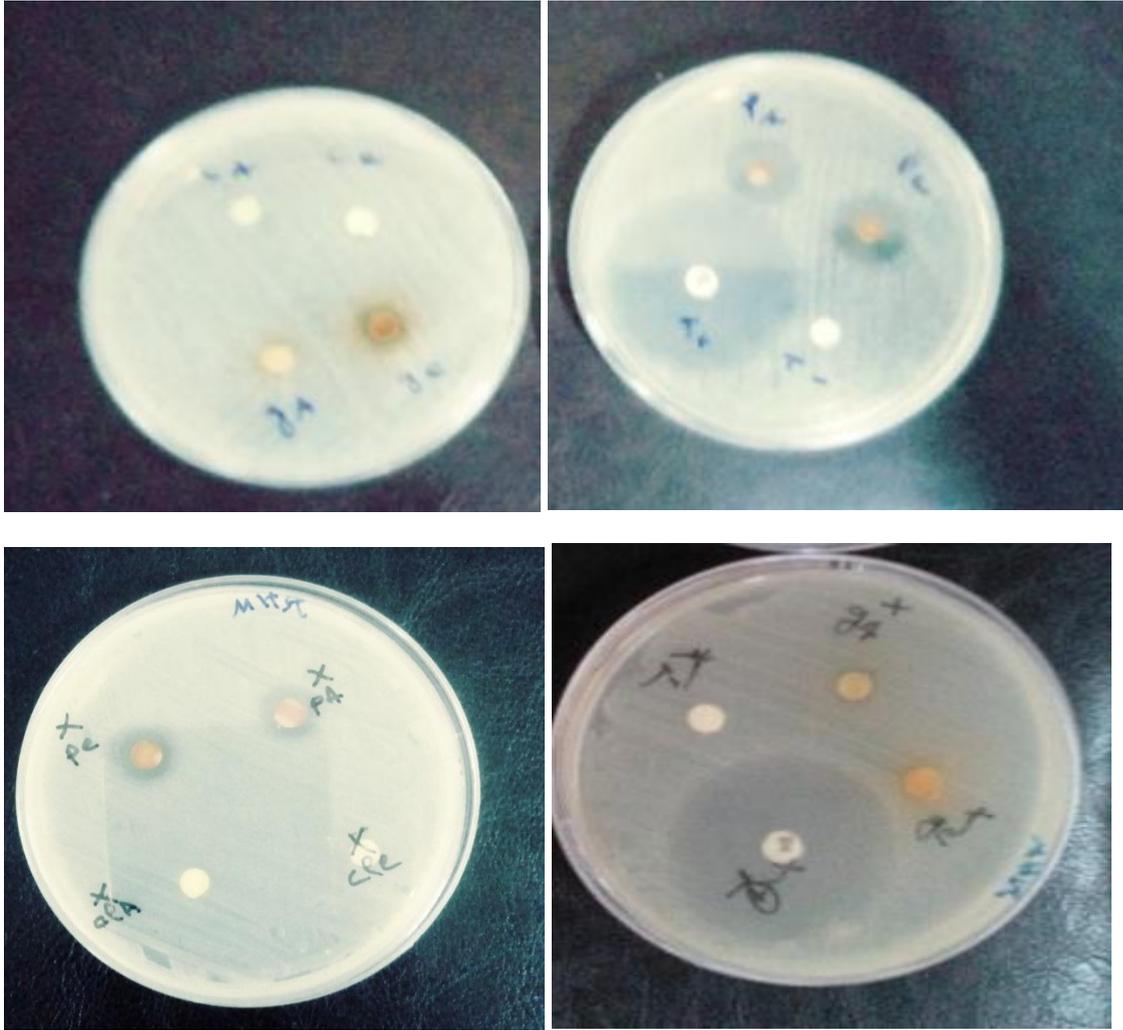
V_2 : Le volume connu de la solution diluée



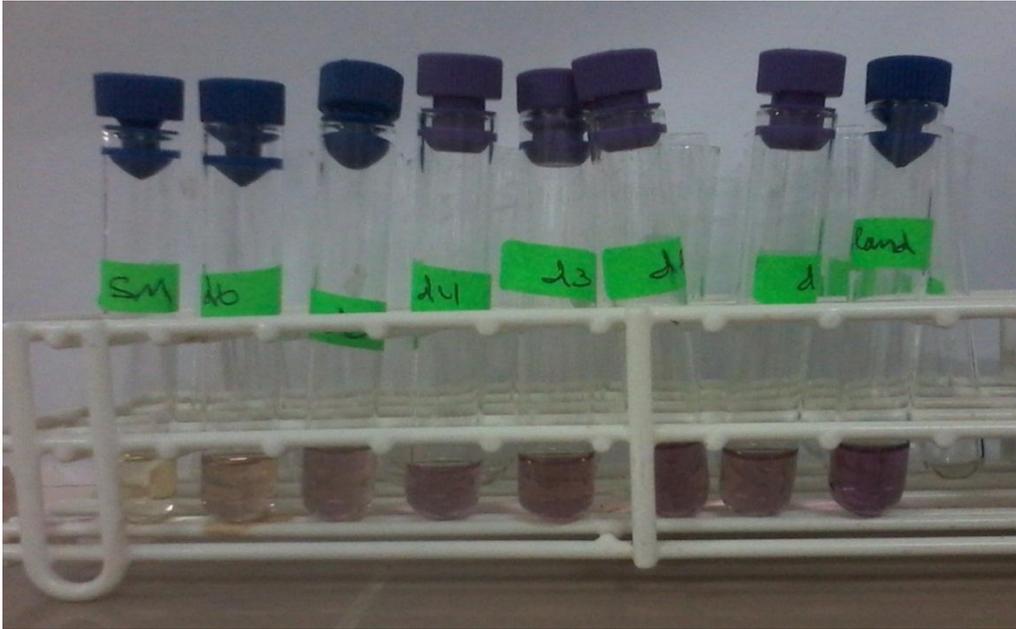
Annexe 2. Les résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits et témoins sur la souche *Escherichia coli* 25922.



Annexe 3. Les résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits et témoins sur la souche *Klebsiella pneumoniae* 4352



Annexe 4. Les résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits et témoins sur la souche *Staphylococcus aureus* 43300



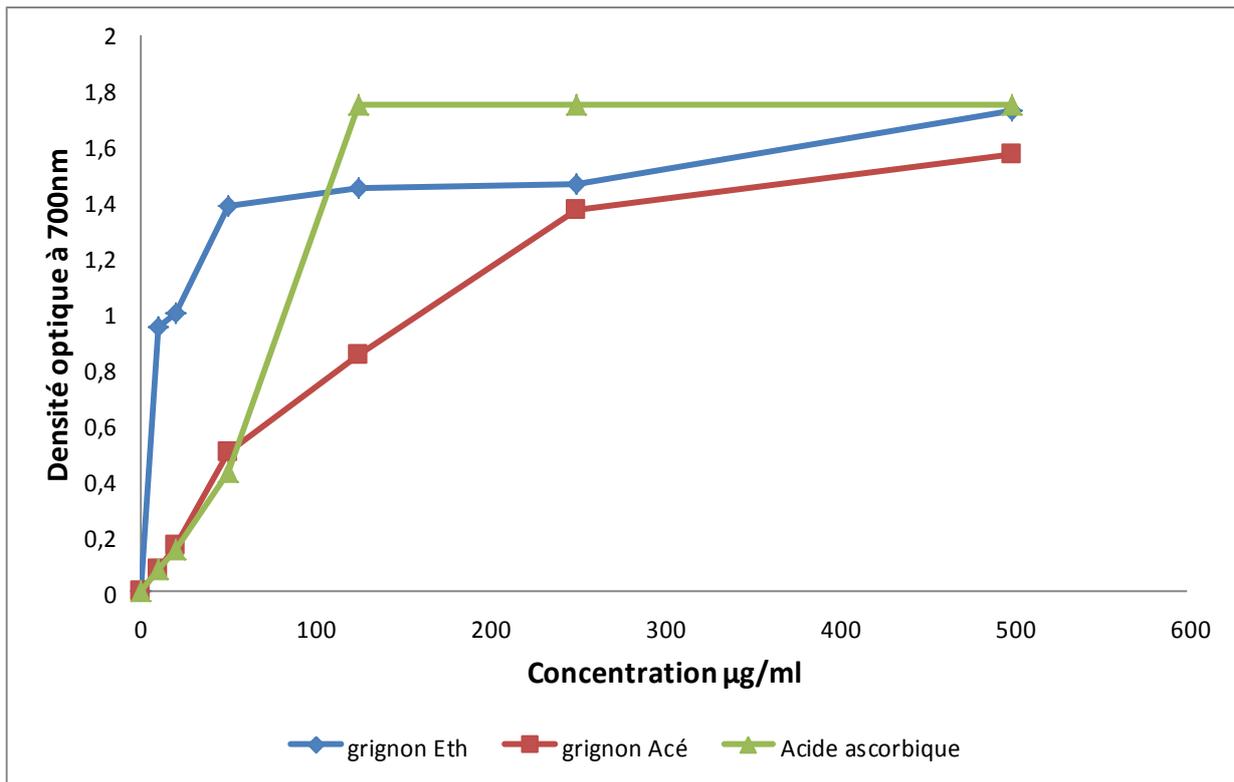
Annexe 5. Photographie de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique pour le test de DPPH (0 à 250 μ g/ml)



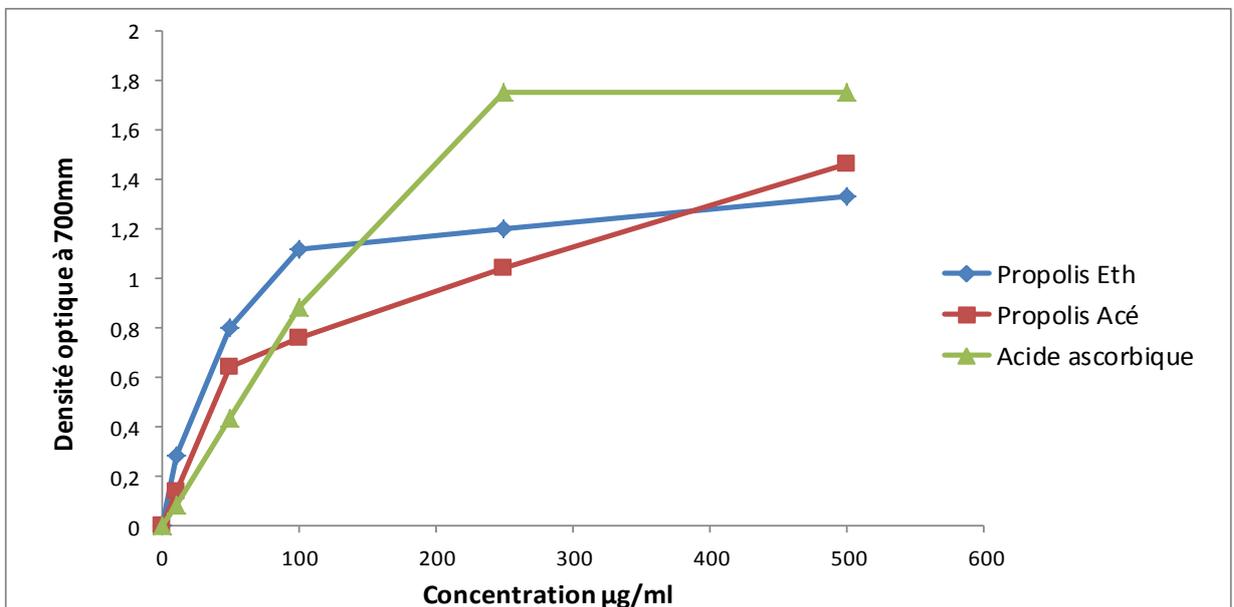
Annexe 6. Photographie des deux extraits de grignons d'olives avant évaporation des solvants (Acétate d'éthyle et éthanol)



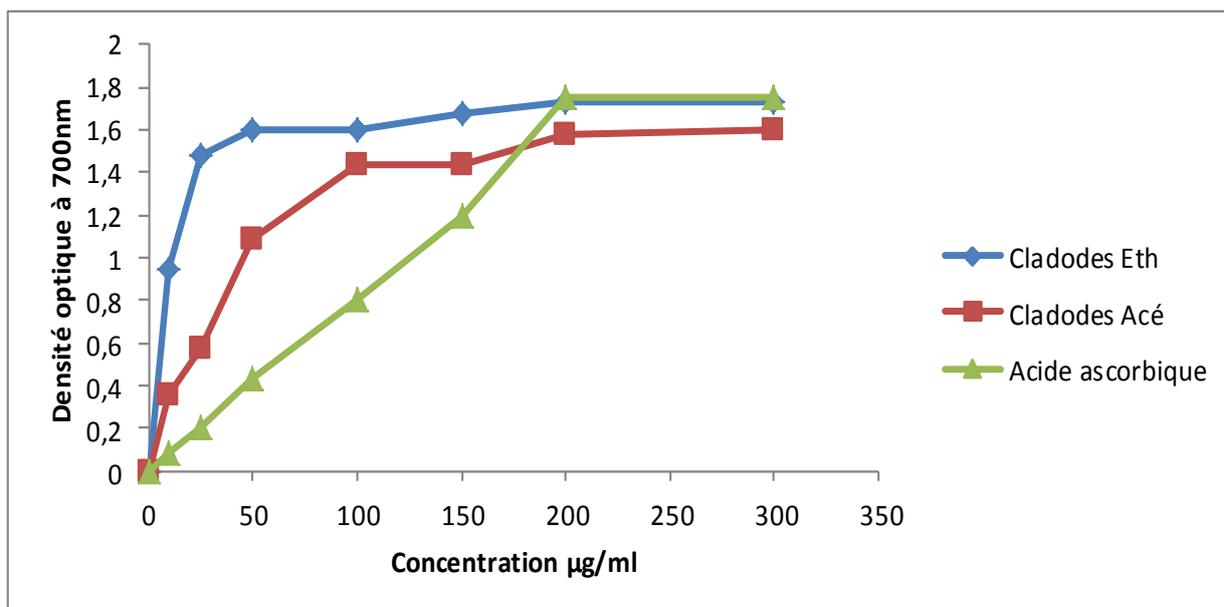
Annexe 7. Photographie des deux extraits de cladodes de figuier de barbarie avant évaporation des solvants (Acétate d'éthyle et éthanol)



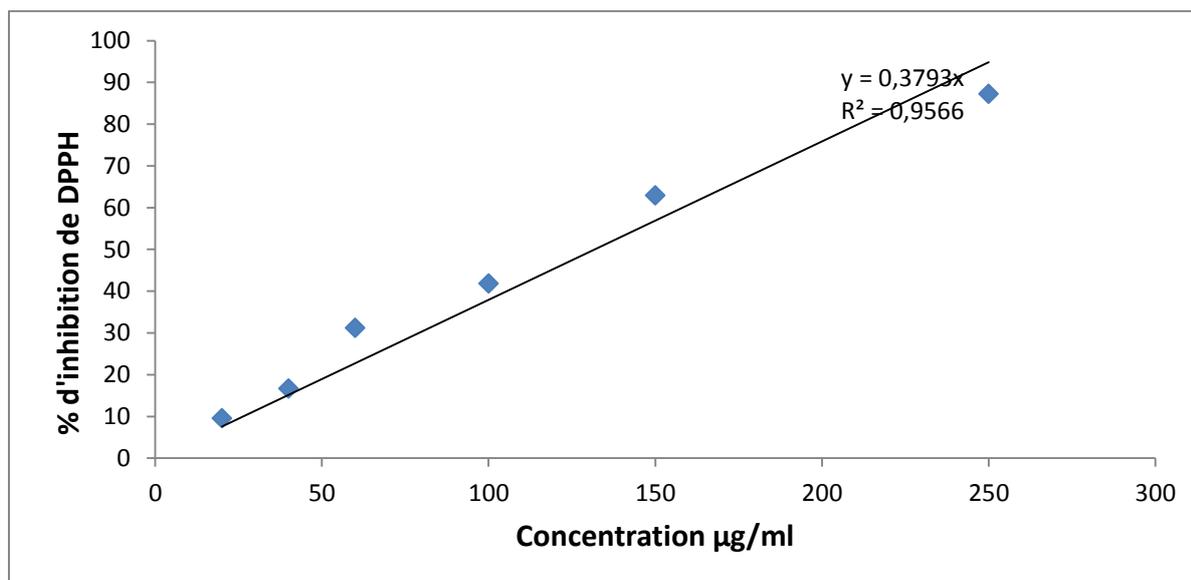
Annexe 8. Pouvoir réducteur de l'EEG, de l'EAG et de l'acide ascorbique



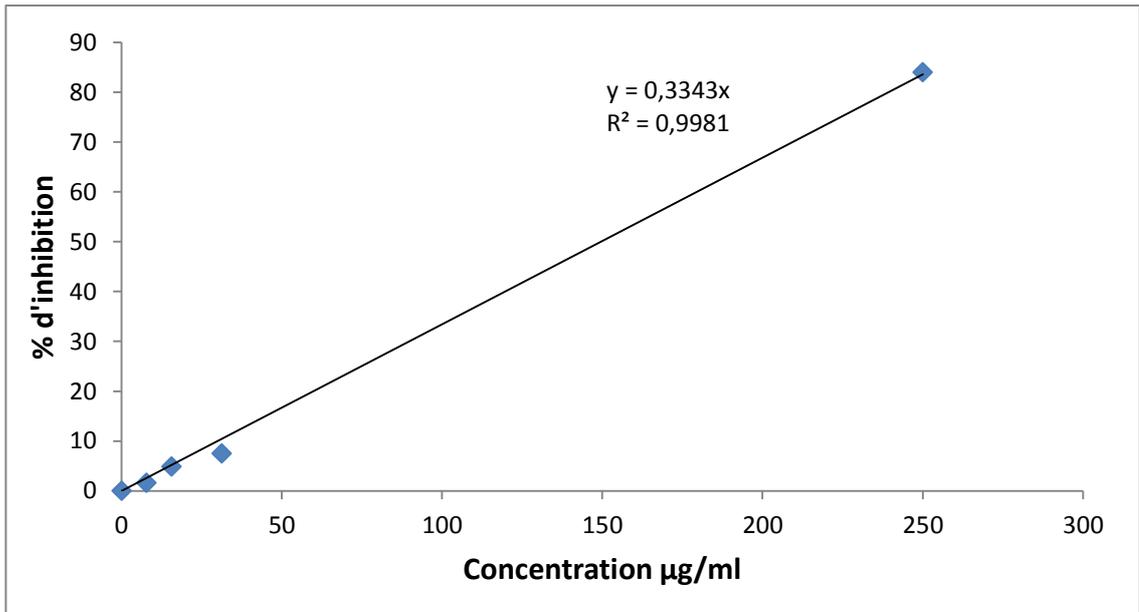
Annexe 9. Pouvoir réducteur de l'EEP, de l'EAP et de l'acide ascorbique



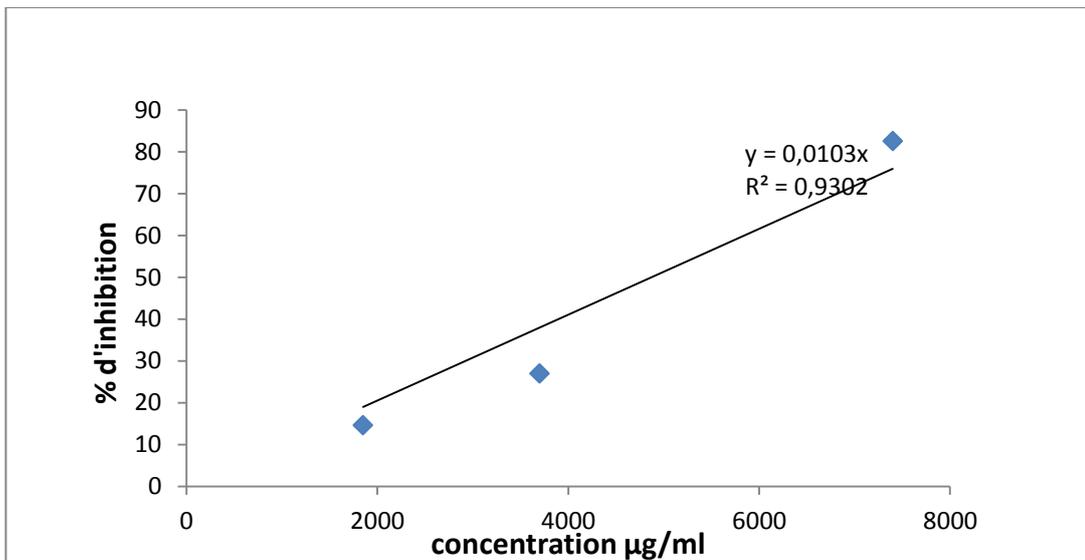
Annexe 10. Pouvoir réducteur de l'EEC, de l'EAC et de l'acide ascorbique



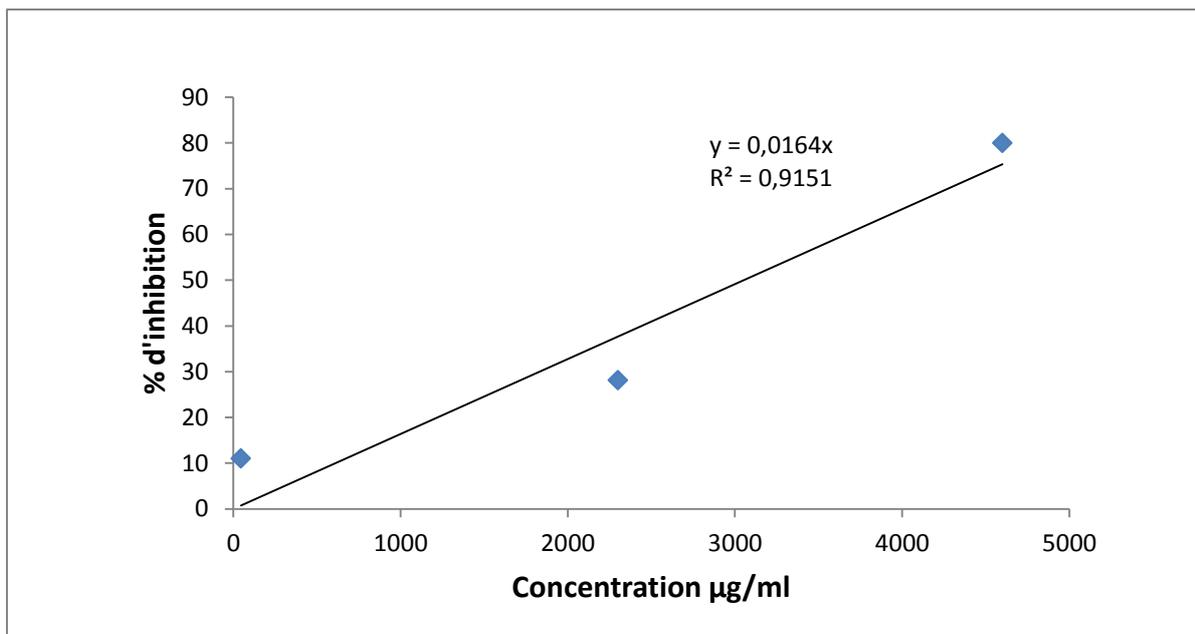
Annexe 11. Courbe d'étalonnage de l'activité anti-radicalaire de l'acide ascorbique (réduction du radical DPPH⁺)



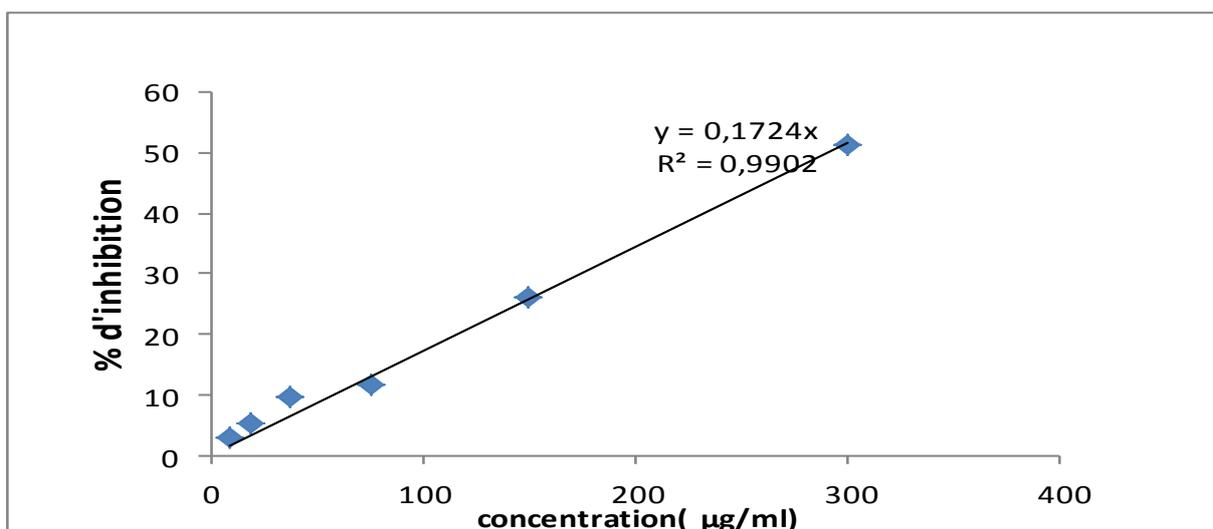
Annexe 12. Courbe d'étalonnage de l'activité anti-radicalaire de l'acide gallique (réduction du radical DPPH.+)



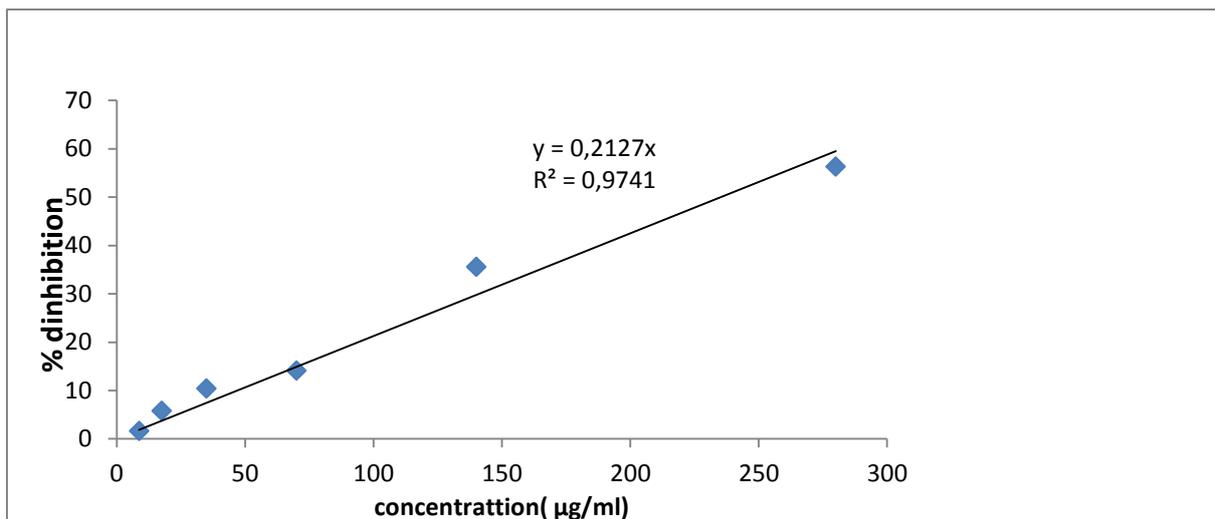
Annexe 13. Courbe de l'activité anti-radicalaire des polyphénols des EEP (test de DPPH).



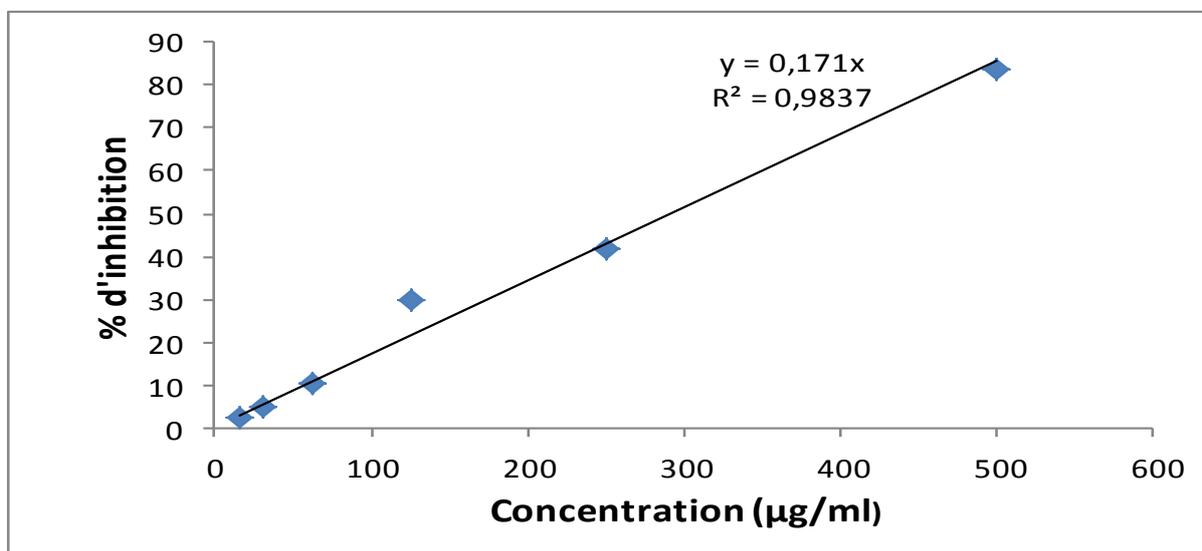
Annexe 14. Courbe de l'activité anti-radicalaire des polyphénols des EAP (test de DPPH).



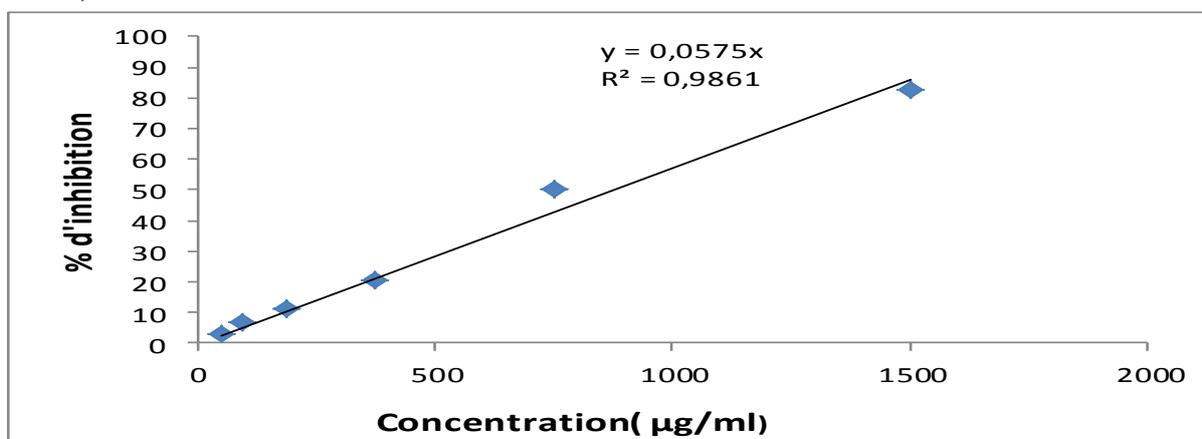
Annexe 15. Courbe de l'activité anti-radicalaire des polyphénols des EEC (test de DPPH).



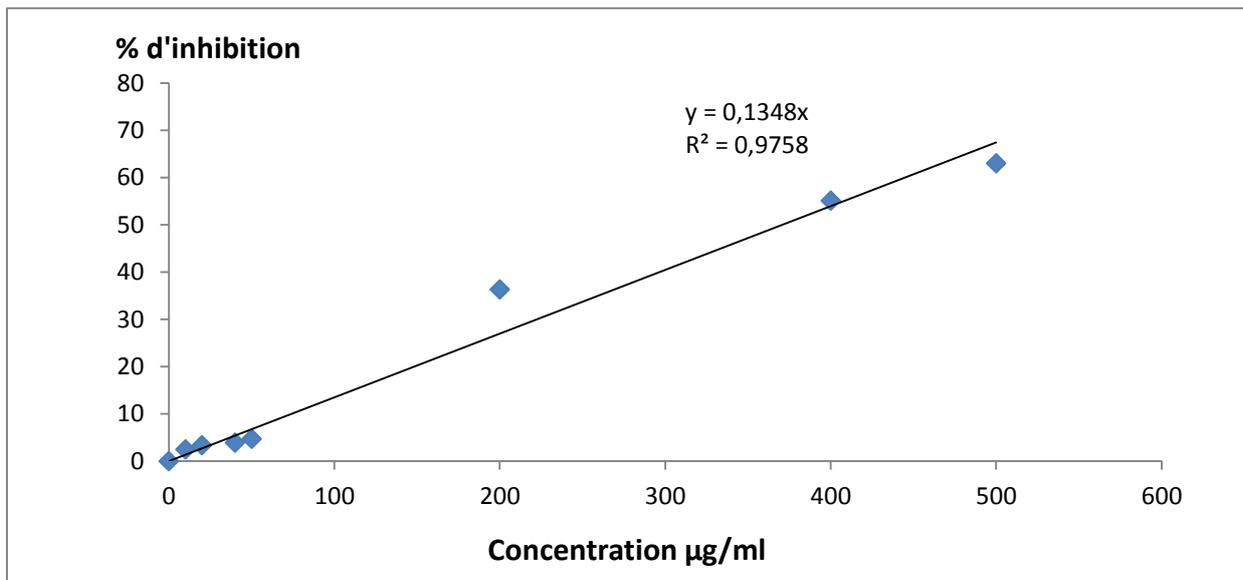
Annexe 16. Courbe de l'activité anti-radicalaire des polyphénols des EAC (test de DPPH).



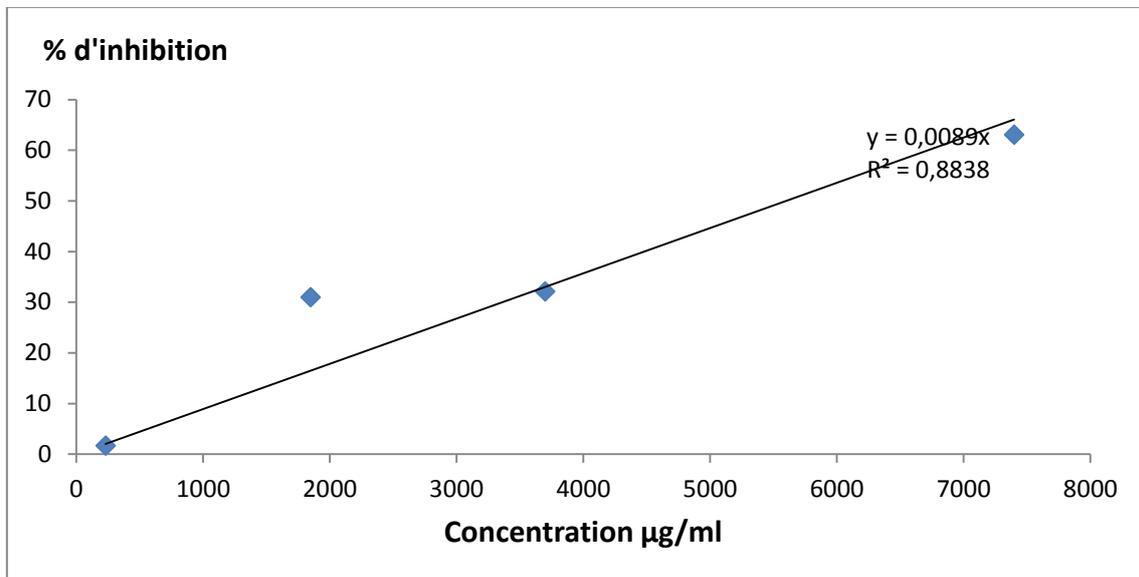
Annexe 17. Courbe de l'activité anti-radicalaire des polyphénols des EEG (test de DPPH).



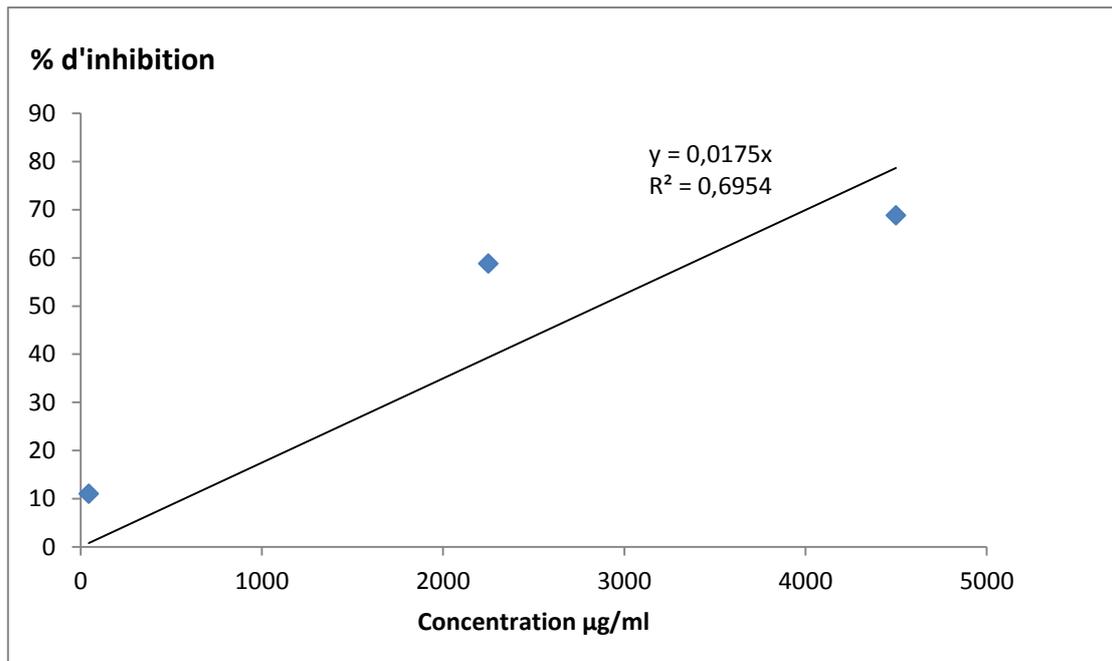
Annexe 18. Courbe de l'activité anti-radicalaire des polyphénols extraits EAG (test de DPPH).



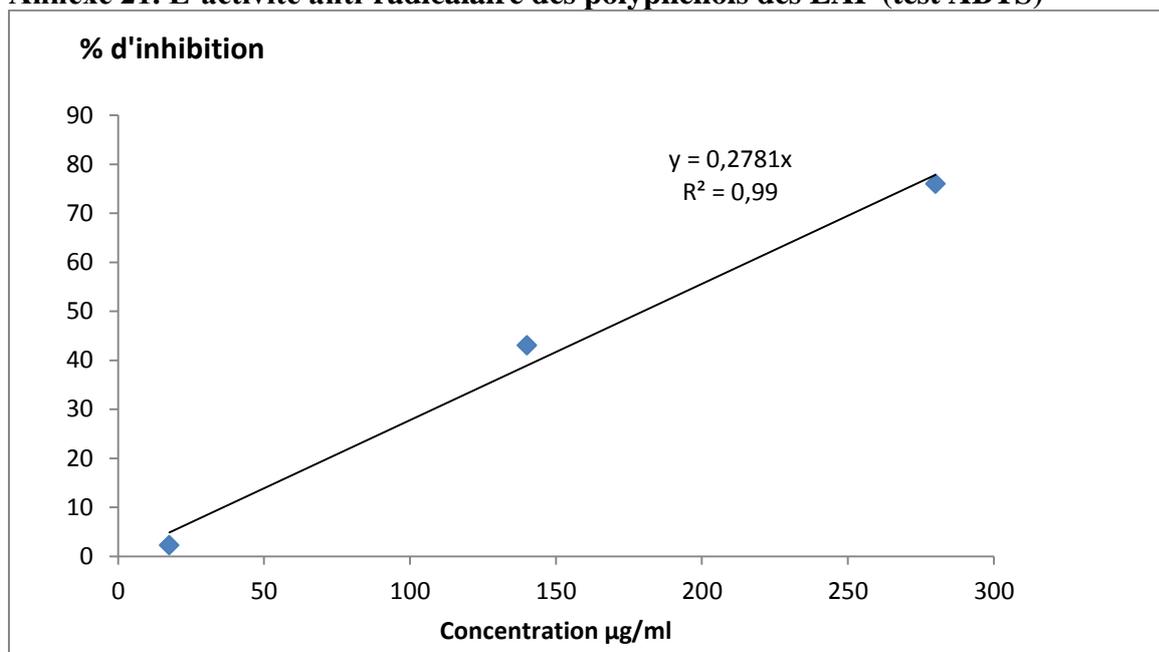
Annexe 19. Courbe de l'activité anti-radicalaire de l'acide ascorbique (réduction du radical ABTS⁺)



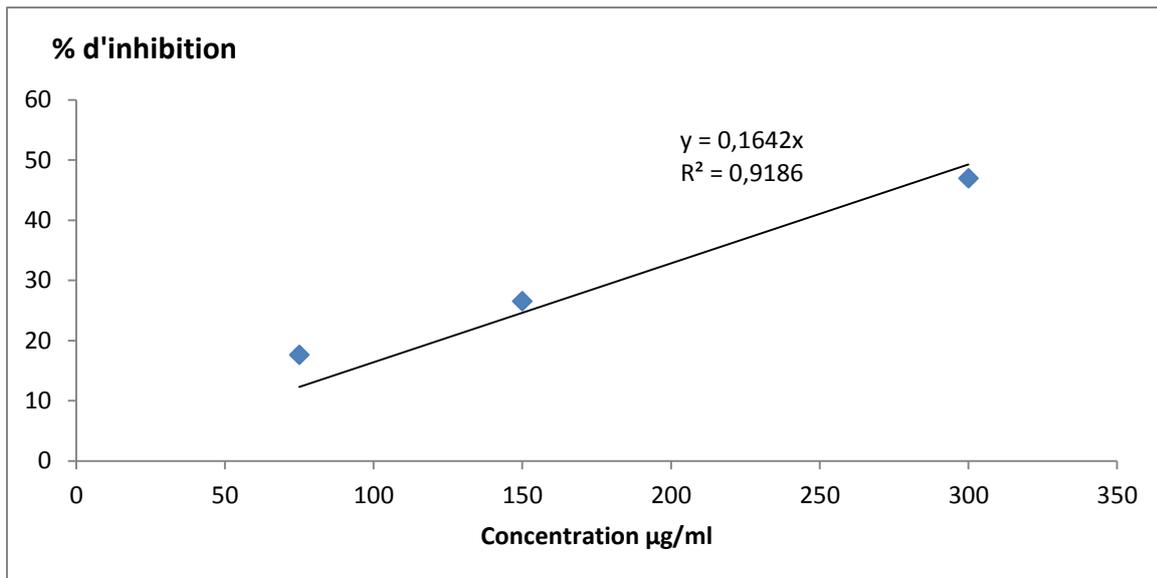
Annexe 20. L'activité anti-radicalaire des polyphénols des EEP (test ABTS)



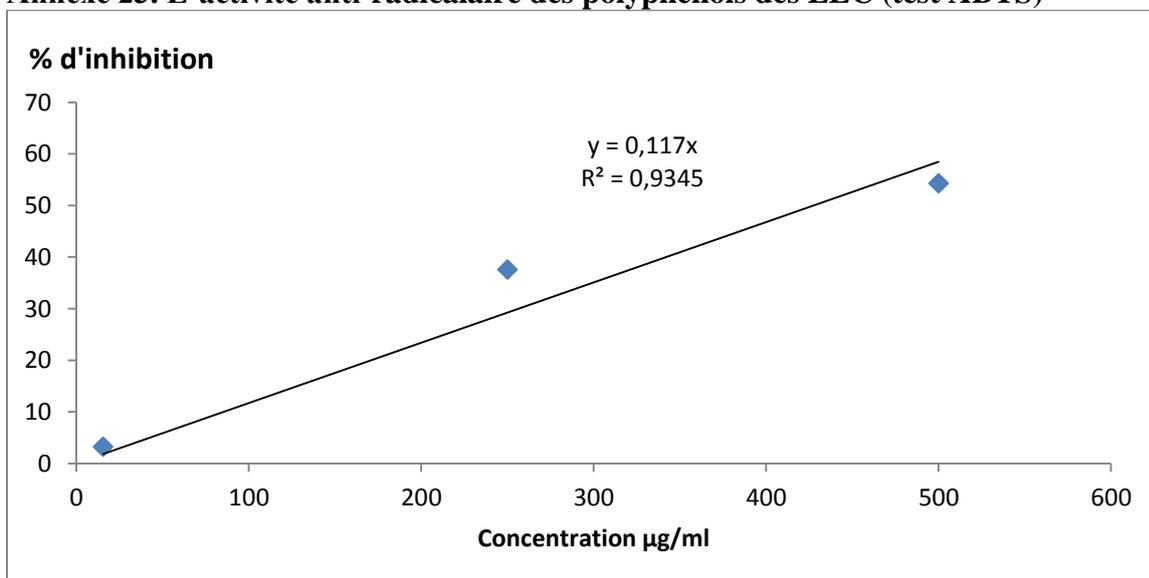
Annexe 21. L'activité anti-radicalaire des polyphénols des EAP (test ABTS)



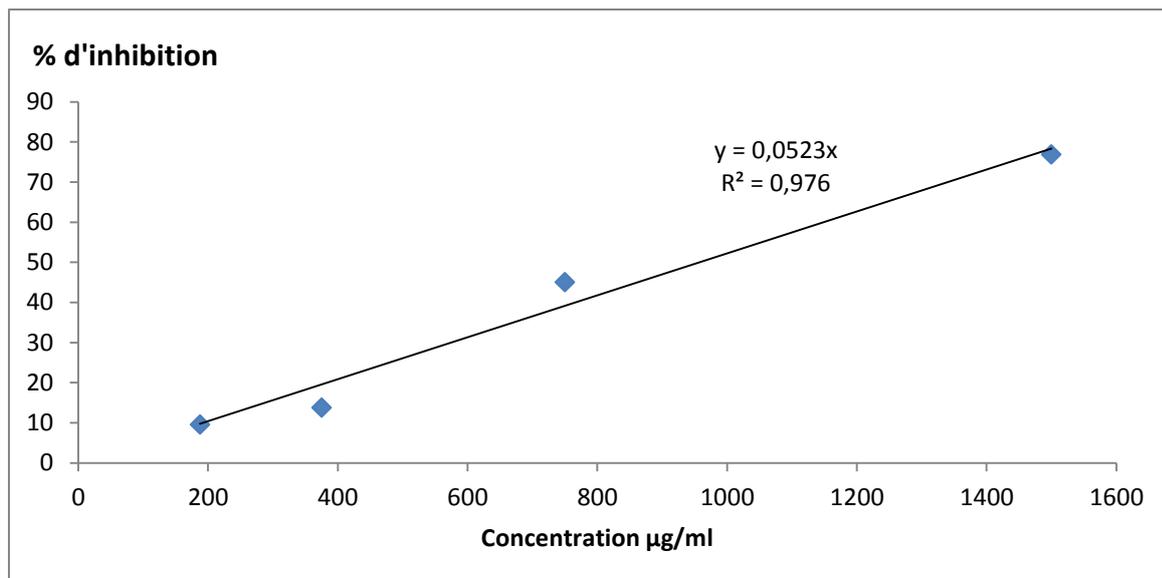
Annexe 22. L'activité anti-radicalaire des polyphénols des EAC (test ABTS)



Annexe 23. L'activité anti-radicalaire des polyphénols des EEC (test ABTS)



Annexe 24. L'activité anti-radicalaire des polyphénols des EEG (test ABTS)



Annexe 25. L'activité anti-radicalaire des polyphénols des EAG (test ABTS)

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- **ABDEL-FATTAH N.S.et NADA O.H. (2007).** Effect of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology.* **37**, 691–710.
- **ABIDI S., BEN SALEM H., VASTA V.et PRIOLO, A. (2009).** Supplementation with barley or spineless cactus (*Opuntia ficus indica f. inermis*) cladodes on digestion, growth and intramuscular fatty acid composition in sheep and goats receiving oaten hay. *Small Ruminant Research.* **87**, 9–16.
- **ABOU RAJI EL FEGHALI P., IBRAHIM R.et NAWAS T. (2018).**Antibacterial activity of *Curcuma longa*, *Opuntia ficus-indica* and *Linum usitatissimum*. *MOJ Toxicology.* **4 (3)**, 2014-220.
- **ACHAT S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation : Extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques. Thèse de doctorat. Université d'Avignon. France.
- **AGUILERA J.F., EDUARDA M., COLMENERO E., GIL F. et RODRIGUEZ D. (1986).** Valorisation nutritive d'un grignon d'olive traité à la soude. *Annales de zootechnie.* **35 (3)**, 205-218.
- **ALIAKBARIAN B., PALMIERI D., CASAZZA A.A., PALOMBO D.et PEREGO P.(2012).**Antioxidant activity and biological evaluation of olive pomace extract. *Natural Product Research.* **26(19)**, 2280-2290.
- **ANDERSON E. F. (2001).** The Cactus Family. Timber Press, Portland.
- **ANDRADE J.K.S., DENADAI M., SANTOS DE OLIVEIRA C., NUNES M.L. et NARAIN N. (2017).** Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International.* **8(66)**, 1-10.
- **ARBA M. (2006).** 'Dellahia' a cactus pear cultivar from the Mediterranean coast of northern Morocco. *Acta Horticulturae.* **728**, 37-41.
- **ARBA M., BENISMAIL M.C.et MOKHTARI M. (2002).** The cactus pear (*Opuntia spp*) in morocco: main species and cultivar characterization. *Acta Horticulturae.* **581**, 103-109.
- **ARDESTANI A. et YAZDANPARAST R. (2007).** Antioxydant and free radical scavenging potential of Achilleasantolina extracts. *Food chemistry.* **104**, 21-29.
- **BANKOVA V. (2005).** Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology.* **100**, 114–117.
- **BANKOVA V., DYALGEROV A., POPOV S. et MAREKOV N.L. (1987).** AGC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Zeitschrift fur Naturforschung.* **42**, 147-151.
- **BANKOVA V., POPOVA M., BOGDANOV S.et SABATINI A.G. (2002).** Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences.* **57**, 530–533.

- **BARBERA G., CARIMI F. et INGLESE P. (1992).** Past and role of the Indian-fig prickly pear (*Opuntia ficus-indica*(L) Miller, Cactaceae) in the agriculture of Sicily. *Economic Botany*. 10-20.
- **BHOOSHAN PANDEY K. et RIVZI S.I. (2009).** Plant polyphénols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. **2(5)**, 270–278.
- **BOUBEKRI C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Salanummelongenena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat. Université Mohand Khider. Biskra, Algérie.
- **BOUDHRIOUA N., BAHLOUL N., BEN SLIMANE I. et KECHAOU N. (2009)** .Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Corps and Products*.**29 (2)**, 412-419.
- **BOUHEROUM M. (2007).** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherium adpressum* et *Ononis angustissima*. Thèse de doctorat. Université de Constantine. Algérie.
- **BOUTAKIOUT A. (2015).** Etude physicochimique, biochimique et stabilité d'un nouveau produit : jus de cladode de figuier de barbarie marocain (*Opuntia ficus indica* et *Opuntia megacantha*). Thèse de doctorat. Nantes Angers. France.
- **BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M.E. et BERSET C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. **28**, 25-30.
- **BRAVO L. (1998).** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56(11)**, 317-333.
- **BRUCKNER H. et WESTHAUSER T. (2003).** Chromatographic determination of L- and damino acids in plants. *Amino Acids*. **24**, 43–55.
- **BRUNETON J. (1993).** Pharmacognosie Phytochimie, Plantes Médicinales. Techniques et Documentation ,2^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.
- **BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. Techniques et Documentation., 3^{ème} Ed, Lavoisier, Paris.
- **CAN Z., YILDIZ O., ŞAHİN H., ASADOV A. et KOLAYLI S. (2015).** Phenolic Profile and Antioxidant Potential of Propolis from Azerbaijan. *Mellifera*. **15(1)**, 16–28.
- **CARDINAULT N., CAYEUX M.O. et PERCIE DU SERT P. (2012).** La propolis : origine, composition et propriétés. *Phytothérapie*.**10**, 298-304.
- **CASTALDO S. et CAPASSO F. (2002).** Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* .**73**, 1-6.
- **COLLIN S. et CROUZET J. (2011).** Polyphénols et Procédés: Transformation des Polyphénols au Travers des Procédés Appliqués à l'agro-Alimentaire. Agence universitaire de la francophonie, Lavoisier, Paris.
- **COTELLE N., BERNIER J.L., CATTEAU J.P., POMMERY J., WALLET J.C et GAYDOU E.M. (1996).** Antioxdantproorties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medecine*. **20**, 35-43
- **COUSIN L. (2014).** L'abeille et le conseil à l'officine. Thèse de doctorat. Université de Poitier. France.
- **CROZIER A., CLIFFORD M.N. et ASHIHARA H. (2006).** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet .Blackwell, Blackwell Publishing Ltd.k, Oxford.

- **DAGLIA M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*.**23 (2)**, 174-181.
- **DALBEN-DOTA K.F., FARIA M.G., BRUSCHI M.L., PELLOSO S.M., LOPES-CONSOLARO M.E. et SVIDZINSKI T.I. (2010).** Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* .**16**, 285–90.
- **DE CASTRO S.L., et HIGASHI K.O. (1995).** Effect of different formulations of propolis on mice infected with Trypanosomacruzi. *Journal of Ethnopharmacology*. **46**, 55–8.
- **DELMAS D., JANNIN B. et LATRUFFE N. (2005).** Resveratrol: preventinf properties against vascular alteractions and ageing. *Molecular Nutrition and Food Research*.**49**, 377-395.
- **DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F. et MICHAUDP. (2013).**Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*. **48**, 1532–1552.
- **DOBROWOLSKI J.W., VOHORA S.B. et SHARMA K. (1991).**Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*. **1 (35)**, 77–82.
- **DONADIEU Y. (1981).**les produits de la ruche. 3^{ème}Ed, paris.
- **EBRAHIMZADEH M.A., NABAVI S.F., MAHMOUDI M., ESLAMI B., et DEHPOUR A.A. (2010).** Biological and pharmacological effects of delphinium elbursense. *African Journal of Biotechnology*. **9(34)**, 5542-5549.
- **EL GHARRAS H. (2009).** Polyphenols: Food sources. Properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*. **44**, 2512-2518.
- **EL-GUENDOUIZ S., AL-WAILI N., AAZZA S., ELAMINE Y., ZIZI S., AL-WAILI T., AL-WAILI A. et LYOUSSI B.(2017).**Antioxidant and diuretic activity of co-administration of Capparis spinosa honey and propolis in comparison to furosemide. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **10(10)**, 974–980
- **EL-MOSTAFA K., EL KHARRASSI Y., BADREDDINE A., ANDREOLETTI P., VAMECQ J., EL KEBBAJ M.S., LATRUFFE N., LIZARD G., NASSER B. et CHERKAOUI-MALKI M.(2014).**Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules*. **19**, 14879-14901.
- **FAROOQUI T. et FAROOQUI A. (2010)** .Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review.*Current Nutrition and Food Science*.**6**, 186–199.
- **FERNÁNDEZ- BOLAÑOS J., FELIZÓN B., BRENES M., GUILLÉN R. et HEREDIA A. (1998).** Hydroxytyrosol and Tyrosol as the Main Compounds Found in the Phenolic Fraction of Steam-Exploded Olive Stones. *Journal of the American Oil Chemists' Society*.**75**, 1–7.
- **FERNÁNDEZ- BOLAÑOS J., RODRIGUEZ G., RODRIGUEZ R., HEREDIA A., GUILLEN R. et JIMENEZ A. (2002).**Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of the two-phase olive oil processing or “alperujo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 6804–11.

- **FERNANDEZ M.L., TREJO A et MC NAMARA D.J. (1990).** Pectin isolated from prickly pear (*Opuntia sp.*) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol-fed guinea pigs. *Journal Nutritionnel*. **120(11)**, 1283-1290.
- **FRANCISCO A., TOMAS-BARBERAN F.A., GARCIA-VIGUERA C., VIT-OLIVIER P., FERRERES F. et THOMAS-LORENTE F. (1993).** Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis From Venezuela. *Phytochemistry*. **1 (34)**, 191-196.
- **GHARBI M. (2011).** Les produits de la ruche : Origines - Fonctions naturelles - Composition Propriétés thérapeutiques Apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire. Thèse de doctorat. Université Claude-Bernard. Lyon, France.
- **GHEDIRA K., GOETZ P. et LE JEUNE R. (2009).** Propolis. *Phytothérapie*. **7**, 100–105.
- **GIBBS C.R. (1976).** Characterization and application of ferrozine iron reagent as a ferrous iron indicator. *Analytical Chemistry*. **48 (8)**, 1197-1201.
- **GIBSON A.C., NOBEL P. (1986).** The Cactus primer. Harvard University Press, Cambridge.
- **GINESTRA G., PARKER M.L., BENNETT R.N., ROBERTSON J., MANDALARI G., NARBARD A., LO CURTO R.B., BISIGNANO G., FAULDS C.B. et WALDRON K.W. (2009).** Anatomical, chemical, and biochemical Characterization of cladodes from Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*(L.) Mill.). *Journal of Agriculture Food Chemistry*. **57 (21)**, 10323-10330.
- **GIROTTICHANU C. (2006).** Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microteadabilis*. Thèse de doctorat. L'institut national des sciences appliquées de Lyon. Paris.
- **GRAIKOU K., POPOVA M., GORTZI O., BANKOVA V. et CHINOU L. (2015).** Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type?. *LWT – Food Science and Technology*. **10 (1016)**, 1-39.
- **GUEVARA-FIGUEROA T., JIMENEZ-ISLAS H., REYES-ESCOGIDO M.L., MORTENSEN A. G., LAURSENC B.B., LIN L., LEON-RODRIGUEZ A., FOMSGAARD I.S. et BARBA DE LA ROSA A.P. (2010).** Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia spp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*. **23**, 525–532.
- **HABIBI Y. (2004).** Contribution à l'étude morphologique, ultra-structurale et chimique de la figue de barbarie (les polysaccharides pariétaux : caractérisation et modification chimique. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier. Faculté Sciences et Géographie (Grenoble I) et Université Cadi Ayyad. Semlalia, Marrakech.
- **HALMI S. (2015).** Etude botanique et phytochimique : Approche biologique et pharmacologique d'*Opuntia ficus indica*. Thèse de doctorat. Frères Mentouri de Constantine. Algérie.
- **HAMDI M. et ELLOUZ R. (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewater by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process. *Environmental Technology*. **19**, 183-188.
- **HARBORNE J.B. (1990).** Constraints on the evolution of biochemical Pathways. *Biol.t. Journal of the Linnean Society*. **39**, 135-151.
- **HOPKINS W. G. (2003).** Physiologie Végétale. De BoeckSupérieur, Paris.
- **JEANDET P., DOUILLET-BREUIL A-C., BESSIS R., DEBORD S., SBAGHI M. et ADRIAN M. (2002).** Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin

- gene expression in transgenic plants, anti-fungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 2731-2741.
- **KATARZYNA U., ANNA M., MARTA M., JOANNA J.B. et GRZEGORZ W. (2007)**. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*. **62** (2), 132-135.
 - **KNAGGS A.R. (2001)**. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*. **18**, 334-355.
 - **KNAGGS A.R. (2003)**. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*. **20**, 119-36.
 - **LAHLAH F.Z. (2008)**. Extraction des flavonoïdes par le butanol, chloroforme à partir de *Silybum marianum*, et étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de magistère. Université de Constantine. Algérie.
 - **LAHSASNI S., KOUHILA M., MAHROUZ M. et JAOUHARI J.T. (2004)**. Drying kinetics of prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica*). *Journal of Food Engineering*. 173-179.
 - **LAVIE, P. (1975)**. La propolis. Edition: Apimondia, Bucharest, paris.
 - **LEANDRO M., LUIS G., JOSE ALBERTO PEREIRA D. et ESTEVINHO L. (2008)**. Antioxydant properties, total phenol and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and chemical toxicology*. **46**, 3482-3485.
 - **LE HOUEROU H.N. (1996)**. The role of cacti (*Opuntia spp.*) in erosion control, land reclamation, rehabilitation and agricultural development in the Mediterranean Basin. *Journal of Arid Environments*. **33**, 135-159.
 - **LEOPOLDINI M., RUSSO N. et TOSCANO M. (2011)**. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. **125** (2), 288-306.
 - **LESAGE-MEESSEN L., NAVARRO D., MAUNIER S., SIGOILLOT J.C., LORQUIN J., DELATTRE M., SIMON J.L., ASTHER M. et LABAT M. (2001)**. Simple phenolic content in oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*. **75**, 501-7.
 - **LOCATELLI M., TRAVAGLIA F., COISSON J.D., MARTELLI A., STEVIGNY C. et ARLORIO M. (2010)**. Total antioxidant activity of hazelnut skin (Nocciola Piemonte PGI): Impact of different roasting conditions. *Food Chemistry*. 1647-1655.
 - **MAATAOUI B.S., HMYENE A. et HILALI S. (2006)**. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruit de figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. **7**(1), 3-8
 - **MACHADO G.M., LEON L.L. et DE CASTRO S.L. (2007)**. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of Leishmania. *The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **102**, 73-7.
 - **MACHEIX J., FLEURIET A. et JAY-ALLEMAND C. (2005)**. Les Composés Phénoliques des Végétaux : un Exemple de Métabolites Secondaires D'importance Economique. Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romandes, Suisse.
 - **MACHEIX J.J., FLEURIET A. et SARNI-MANCHADO P. (2006)**. Les Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Paris.

- **MALAININE M. E., DUFRESNE A., DUPEYRE D., MAHROUZ M., VUONG R. et VIGNON M. R. (2003).** Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus indica*. Cellulose extraction and characterisation. *Carbohydrate Polymers*. **51**, 77–83.
- **MARIOD A.A., IBRAHIM R.M., ISMAIL M. ET ISMAIL N. (2009).** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*. 306-312
- **MARTIN-GARCIA A.I., MOUMEN A., YANEZ D.R. et MOLINA ALCAIDE E. (2003).** Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*. **107**, 61-74.
- **MEHINAGICE., BOURLES E. et JOURJON F. (2011).** Composés des fruits. D'intérêts nutritionnel : impact des procédés de transformation sur les polyphénols. *Revue suisse Viticulture Arboriculture Horticulture*. **43(6)**, 364-368.
- **METZNER J. et SCHNEIDEWIND E. M. (1997).** Studies on the question of potentiating effects of propolis constituents. *Pharmazie*. **33 (7)**, 465.
- **MILANE.H. (2004).** la quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant capture des radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. these de doctorat. Université de Louis Pasteur. France.
- **MOHAMMER M., STINTZING F. et CARLE R. (2006).** Evaluation of different methods for production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 275-287.
- **MOUFFOK S. (2011).** Etude des métabolites secondaires de *Centaurea pubescens* ssp. *Omphalotricha* (Asteraceae). Mémoire de Magister Université de Batna. Algérie.
- **MOURE A., CRUZ J.M., FRANCO D., MANUEL DOMINGUEZ J., SINEIRO J., DOMINGUEZ H., NUNEZ M.J. et CARLOS PARAJO J. (2001).** Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*. 145-171.
- **MOUZAOUI K. YAZZAG L. et MOULTI-MATI F. (2014).** Composés phénoliques des grignons d'olive provenant d'huileries traditionnelle et moderne : essai de purification de l'oléuropeine et de l'hydroxytyrosol. *Sciences et Technologie*. **40**, 9-15.
- **MUNOZ DE CHAVEZ M., CHAVEZ A., VALLES V. et ROLDAN J. A. (1995).** The nopal: a plant of manifold qualities. *World Review of Nutrition and Dietetics*. **77**, 109–134.
- **NACZK M. et SHAHIDI F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*. **1054**, 95–111.
- **NAJAFI F., VAHEDY F., SEYYEDIN M., JOMEHZADEH H.R. et BOZARY K. (2007).** Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition different cells. *Cytotechnology*. **54 (1)**, 49–56.
- **NEDJI N et LOUCIF-AYAD W. (2014).** Antimicrobial activity of Algerian propolis in food borne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. **4(6)**, 433-437
- **NEFFAR S (2012).** Etude de l'effet de l'âge des plantations de figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica* L. Miller) sur la variation des ressources naturelles (sol et végétation) des steppes algériennes de l'Est. Cas de Souk- Ahras et Tébessa. Thèse de doctorat. Université de Badji Mokhtar. Annaba, Algérie.

- **NEFZAOUI A. (1985).** « Valorisation des lignocelluloses dans l'alimentation des ruminants par les traitements aux alcalis. Application aux grignons d'olive ». Thèse de doctorat d'état, Université Catholique de Louvain.
- **NEFZAOUI A. (1988).** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. *Olivae*. **19**, 17-21.
- **NEFZAOUI A., MOLINA E., OUTMANI A. et VANDELLE M. (1985).** ensilados de orujo de aceitunatrados con alcalis. Composition química, digestibilidad in sacco y degradabilidad. *Archivos de Zootecnia* .**33(127)** ,219-236.
- **NERD A., KARADI A. ET MIZHARI Y. (1991).** Salt tolerance of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*). *plant and soil*.**137(2)**, 201-207.
- **ORSI R.O., FUNARI S.R.C., SOARES A.M.V.C., CALVI S.A., OLIVEIRA S.L., SFORCIN J.M. et BANKOVA V. (2000).** Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxin*.**6**, 205–19.
- **OUNAS A., BERGACH N., ENNACIRI K., YAACOUBI A. et BACAOUI A. (2009).** Préparation des charbons actifs à partir des déchets de l'industrie oléicole. *Agriculture durable en région méditerranéenne*. 393-397.
- **OUYAIZU M. (1986).** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. **44**, 307-315
- **OZCAN M. (2004)** Inhibition of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by pollen and propolis extracts. *Journal of Medicinal Food*. **7**, 114–6.
- **PAIXAO N., PERESTRELO R., MARQUES J.C. et CAMARA J.S. (2007).** Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry*.**105**, 204–214.
- **PASCUAL-REGUERA M.I., ORTEGA-CARMONA I et MOLINA-DIAZ A. (1997).** Spectrophotometric determination of iron with ferrozine by flow-injection analysis. *Talanta*.**44(10)**, 1793-1801.
- **PERRIN R. et SCHARFF J.P. (1995).** Chimie industrielle, Ed Masson, paris.
- **PETTI S. et SCULLY C. (2009).** Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry*, **37**, 413-423.
- **PHAM HUY L., HE H. et PHAM-HUY C. (2008).** Green tea and health: an overview. *Journal Food Agriculture Environnement*. **6(1)**, 6–13.
- **PHILIPS A., PHILIPS. S., ARUL V., PADMAKEERTHIG B., RENJU V. et SANTHA S. (2010).** Free radical scavenging activity of leaf extracts of *Indigofera aspalathoides* – An in vitro analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*.**2**, 322-328.
- **PIETTA P.G., GARDANA C. et PIETTA A.M. (2002).** Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*.**73** (1), 7-20 .
- **PIMIENTA-BARRIOS E. (1994).** Prickly pear (*Opuntia spp*) a valuable fruit crop for the semi-arid land of Mexico. *Journal of Arid Environment*.**28**, 1-11.
- **PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. et ROURA S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*. 500-508.
- **PORTES E. (2008).** Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de doctorat. Université Bordeaux I. France.

- **PRIOR R.L., LAZARUS S.A., CAO G., MUCCITELLI H. et HAMMERSTONE J.F. (2001).** Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*vaccinium spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**, 1270-1276.
- **PRISCILLA D.H. et PRINCE S.M. (2009).** Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in wistar rats. *Chemico-Biological Interactions*. **179**, 118-124.
- **RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M. et RICE-EVANS C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. **26 (9/1)**, 1231–1237
- **REYES-AGUERO J.A., AGUIRRE J.R. et VALIENTE-BANUET A. (2006).** Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *Journal of Arid Environments*. 549-589.
- **REZAIRE A. (2015).** Activité antioxydante et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua (patawa)*. Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane. France.
- **RICHARD A. et DIXON L. (1995).** Stress-Induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*. **7**, 1085-1097.
- **RIOV J. et GOTTLIEB H.E. (2006).** Metabolism of auxin in pine tissues: indole-3-acetic acid conjugation. *Physiologia Plantarum*. **50**, 347-352
- **ROUX D et CATIER O. (2007).** Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. Cahiers du préparateur en pharmacie, 3^{ème} Ed, Wolters Kluwer France, Paris.
- **RYAN D., PRENZLER P.D., LAVEE S., ANTOLOVICH M. et ROBARDS K. (2003).** Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 2532–8.
- **SAENZ C., SEPULVEDA E. et MATSUHIRO B. (2004).** *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments*. 275-290.
- **SARTORI-THIEL A. (2003).** Activités anti microbienne d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. Thèse de doctorat. Université d'Avignon. France.
- **SCAZZOCCHIO F. D'AURIA F.D., ALESSANDRINI D. et PANTANELLA F. (2006)** Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*. **161**, 327–33.
- **SCHNITZLER P., NEUNER A., NOLKEMPER S., ZUNDEL C., NOWACK H., SENSCH K.H. et REICHLING J. (2010).** Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research*. **24 (1)**, 8-20.
- **SEBBAN A., BAHLOUL A., SAADOUNE M., AIT KASSI A., BERRADA M., PINEAU J. L. et KITANE S. (2004).** Schéma de valorisation des grignons d'olives produits par les maasras marocaines. *Revue francophone d'écologie industrielle*. **34**, 39-43..
- **SFORCIN J.M. (2007).** Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. **113**, 1–14.

- **SFORCIN J.M. (2016).** Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapyresearch* .**30**, 894–905.
- **SINGLETON V.L. et AROSSI J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technologie and Viticultur*. **16**, 144-153.
- **SOMAIE S., KARIMINIK A. et HASANABADI Z. (2013).** Antimicrobial activity of methanol extracts of *Opuntiastricta*F. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. **7(12)**, 907-910.
- **STINTZING F.C. et CARLE R. (2005).** Cactus stems (*Opuntiaspp*): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition and Food Research*, **49**, 175-194.
- **STINTZING F.C., SCHIEBER A. et CARLE R. (2001).** Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research and Technology*. **212**, 396-407.
- **SUTTON B.C., TING I.P. et SUTTON R. (1981).** Carbohydrate metabolism of cactus in a desert environment. *Plant Physiology*. **68**, 784-787.
- **TELES F. F. F., STULL J. W., BROWN W. H. et WHITING F. M. (1986).** Amino and organic acids of the prickly pear cactus (*Opuntiaficus-indica*L.). *Journal Scientifique Food Agriculture*. **35**, 421–425.
- **TELES F. F. F., WHITING F. M., PRICE R. L. et BORGES V. E. L. (1997).** Protein and amino acids of nopal (*Opuntiaficus-indica* L.). *Revista Ceres*, **44**, 205–214.
- **TOSI E.A., CIAPPINI M.C., CAZZOLI A. et TAPIZ L.M. (2006).** Physico chemical characteristics of propolis collected in santafe (Argentina). *Apiacta*.**41**, 110-120.
- **TROUILLAS P., CALLISTE C.A., ALLAIS D.P., SIMON A., MARFAK A., DELAGE C. et DUROUX J.L.(2003).** Antioxydant ,anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen plant extracts used in the Limousin countryside as herbeltea .*Food and chemistry*. **3**, 399-400.
- **TSAO R. (2010).**Chemistry and biotechnology of dietary polyphénols. *Nutrient*.**2**, 1231-1246.
- **VLYSSIDES A.G., LOIZIDES M. et KARLIS P.K. (2004).**Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*, **12**, 603–611.
- **WALLACE R.S. et GIBSON A.C. (1997).**Cacti: Biology and Uses. Park S. Nobel, California.
- **WATANABE M.A.E., AMARANTE, M.K., CONTI, B.J. et SFORCIN, J.M. (2011).** Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **63**, 1378–1386.
- **YEN G-C., DUH P-D. et TSAI H-L. (2002).** Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*.**79**, 307–313.
- **ZABAIYOU N., FOUACHE A., TROUSSON A., BARON S. ZELLAGUI A., LAHOUEL M. et LOBACCARO J.M. (2017).**Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*. **4544**, 1-9.
- **ZAIDI F., HASSISSENE N., ALLOUACHE H., KICHOU M., OURDANI S., REZKI K., BELLA M. M., GRONGNET J.F et YOUYOU A. (2009).**Les

composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants .*Revue de Médecine Vétérinaire*.**16 (2)**, 67-73.